世界知的所有権機関
国際事務局

PCT 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6
C12N 15/12, C12P 21/02, C12N 1/21, 5/10, G01N 33/53, C07K 14/435, 16/18, A61K 38/17, 39/395

A1

(11) 国際公開番号 WO97/38099

(43) 国際公開日 1997年10月16日(16.10.97)

(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01236

(22) 国際出願日 1997年4月10日(10.04.97)

(30) 優先権データ
特願平8/113035 1996年4月11日(11.04.96) JP
特願平8/355847 1996年12月25日(25.12.96) JP

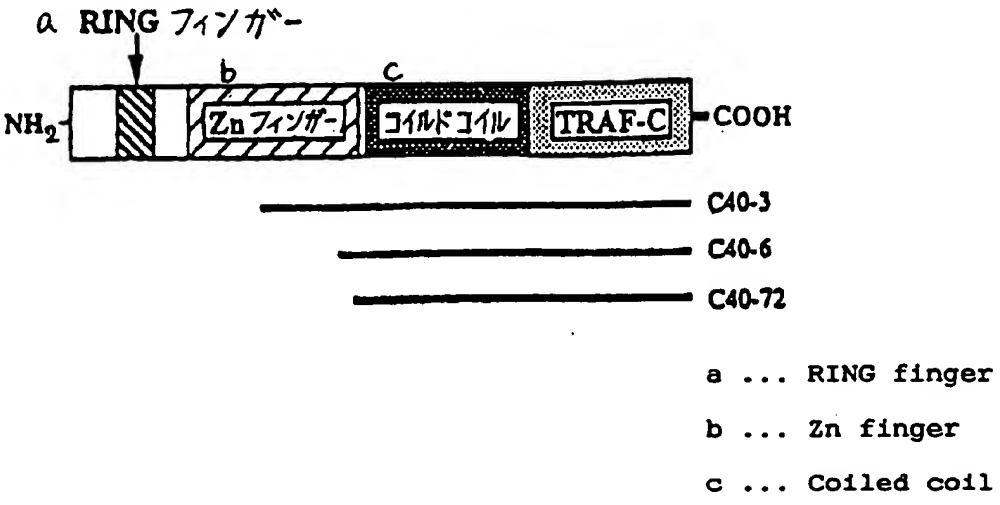
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
持田製薬株式会社
(MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP]
〒160 東京都新宿区四谷一丁目7番地 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
井上純一郎(INOUE, Jun-ichiro)[JP/JP]
〒167 東京都杉並区荻窪三丁目32番10号 Tokyo, (JP)
(74) 代理人
弁理士 阿部正博(ABE, Masahiro)
〒274 千葉県船橋市前原西二丁目14番1号
ダイアパレス津田沼317号 Chiba, (JP)

(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: NOVEL SIGNAL TRANSDUCER

(54)発明の名称 新規シグナル伝達物質



(57) Abstract

TRAF5 as a novel protein and a polypeptide as a part thereof; a DNA encoding these; an antisense oligonucleotide against the DNA; an anti-TRAF5 antibody; a vector containing the DNA; a transformant prepared by using the vector; processes for producing the TRAF5 and the polypeptide as a part thereof; methods of screening substances binding to the TRAF5 or the polypeptide, substances regulating the activities of the same, and substances regulating the expression of the same by using the TRAF5 and the polypeptide; novel substances obtained by the screening; and various remedies containing these substances as the active ingredient.

（５７）要約

本発明は，新規な蛋白質であるＴＲＡＦ５及びその一部であるポリペポチド，これらをコードするＤＮＡ，該ＤＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド，抗ＴＲＡＦ５抗体，該ＤＮＡを含有するベクター，該ベクターによる形質転換体，該ＴＲＡＦ５及びその一部であるポリペポチドの製造方法，該ＴＲＡＦ５及びその一部であるポリペポチドを使用する，それらに結合する物質，それらの活性を調節する物質，およびそれらの発現を調節する等のスクリーニング方法、該スクリーニングによって得られる新規な物質、並びに、これらを有効成分として含有する各種治療薬を提供するものである。

明細書

新規シグナル伝達物質

技術分野

本発明は、ＣＤ４０に結合してシグナルを伝達する蛋白質であるＴＲＡＦ５（Ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｆａｃｔｏｒ）及びその各領域ポリペプチド（その一部のポリペプチド）、それらをコードするＤＮＡ、該ＤＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、これらＴＲＡＦ５及びその各領域ポリペプチドに対する各種抗体、該ＤＮＡを含む発現ベクター、該発現ベクターによる形質転換体、該形質転換体を使用する上記ＴＲＡＦ５、その各領域ポリペプチドの製造方法、およびに上記ＴＲＡＦ５及びその各領域ポリペプチドを使用した，それらに結合する物質，それらの活性を調節する物質又はそれらの発現を調節する物質等のスクリーニング方法、並びに各種治療薬に関するものである。

背景技術

Ｂ細胞は抗原認識後、Ｔ細胞との相互作用のもと、クローナルに増殖して抗体産生細胞へと分化する。抗原特異的なＴ細胞との会合がないとそのＢ細胞は自己認識したものとして増殖を止め、不活性化されるか、細胞死を引き起こすと考えられている。この細胞死を阻害する活性がＣＤ４０からのシグナルに存在することが明らかになり、末梢血におけるＢ細胞の排除機構の制御にもＣＤ４０が深く関与していることが示唆されている(Liu,Y.-J. et al., Nature, 342, 929,1989, Tubata, T. et al., Nature, 364, 645, 1993)。さらに、ＣＤ４０を介したシグナルは

免疫グロブリンのアイソタイプのスイッチングや胚中心の形成、抗体のアフィニティーマチュレーションに重要な役割を果たしている(Banchereau, J., et al., Annu. Rev. Immunol., 12, 881, 1994)。またＣＤ４０を介したシグナルは、低親和性ＩｇＥレセプターＣＤ２３の発現を誘導する（Cheng, G., et al., Science. 267, 1994）。また転写因子ＮＦｋＢの活性化にも関与することが知られている（Berberich, I., et al., J. Immunol., 153, 4357, 1994）。

ＣＤ４０はＢ細胞以外にＢ細胞前駆細胞、活性化マクロファージ／単球、濾胞性樹状細胞、ランゲルハンス細胞、胸腺上皮細胞や種々の癌細胞等にも発現しており(Banchereau, J., et al., Annu. Rev. Immunol., 12, 881, 1994)、ＣＤ４０を介したシグナルはＢ細胞の活性化、増殖および分化に重要であるばかりでなく、抗腫瘍活性、サイトカイン産生、Ｔ細胞活性化にも関与することが示唆されている。

ＣＤ４０は細胞外領域には４個のシステインリッチモチーフを有し、ＴＮＦＲ－１，２（Ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ－１，２）、Ｆａｓ、ＯＸ４０、ＣＤ３０とともにＮＧＦＲファミリーに属するＩ型の膜蛋白である。

また、ＣＤ４０のリガンド（ＣＤ４０Ｌ）は活性化したＴ細胞上に発現されていることが報告され（Armitage R. J. et al., Nature 357, 80, 1992)、ＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌシステムはｂ細胞－Ｔ細胞の会合時における重要な情報伝達システムであると考えられるようになった。

最近、ＴＮＦＲ－２の細胞内ドメインに結合するシグナル伝達物質としては、ＴＲＡＦ（Ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｆａｃｔｏｒ）ドメインを有するＴＲＡＦ１やＴＲＡＦ２が、ＣＤ４０の細胞内ドメインに結合するシグナル伝達物質としてはＣＤ４０ｂｐ、ＬＡＰ－１、又はＴＲＡＦ－

3ともよばれているＣＲＡＦ１（ＣＤ４０ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｆａｃｔｏｒ Cheng et al., Science, 267, 1494, 1995）が明らかにされている。

今回、本発明者はマウスＣＤ４０の細胞内ドメイン蛋白質を利用したtwo-hybrid スクリーニング法によって、ＣＤ４０の細胞内ドメインに結合し、ＴＮＦＲ－２とは結合しない新規なシグナル伝達物質であるマウスＴＲＡＦ５（本出願の優先権の基礎である特願平８－１１３０３５（平成８年４月１１日出願）ではＣＲＡＦ２の名前で記載されている同一の物質であり、当該分野の現在の動向に合わせ名称を変更した。）のクローニングに成功した。さらに、ヒトＴＲＡＦ５についてもマウスＴＲＡＦ５の配列を基にしてクローニングに成功して、本発明を完成させた。

発明の開示

即ち、本発明は、ＣＤ４０の細胞内ドメインと結合するシグナル伝達物質である新規な蛋白質であるＴＲＡＦ５に係わる。

本発明は、ＣＤ４０の細胞内ドメインと結合しＴＮＦＲ－２と結合しない、シグナルを伝達する蛋白質であるＴＲＡＦ５にも係わる。

本発明のＴＲＡＦ５は、その起源は特に限定されない。本発明のＴＲＡＦ５の具体例はマウスおよびヒトのＴＲＡＦ５であり、配列表の配列番号１および配列番号４に示されるアミノ酸配列、もしくはその部分配列で特徴づけることができる。

尚、上記のアミノ酸配列は、本発明のＴＲＡＦ５の１具体例にすぎず、ＣＤ４０の細胞内ドメインと結合し、ＴＮＦＲ－２とは結合しない、あるいは結合する、シグナルを伝達する蛋白質である限り、該アミノ酸配列において、アミノ酸の欠失、置換及び付加等によって、その一部が

異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドも、本発明のＴＲＡＦ５に含まれるものである。また、糖鎖、ポリエチレングリコール等を結合させたもの、他の蛋白質と結合させた融合蛋白等も、ＴＲＡＦ５の活性を有すれば、本発明のＴＲＡＦ５に含まれる。本発明のＴＲＡＦ５は、従来知られているＴＮＦＲ－２又はＣＤ４０の細胞内ドメインに結合するＴＲＡＦドメインを有するＴＲＡＦ１、ＴＲＡＦ２、ＣＲＡＦ１とは異なる。ＣＤ４０の細胞内ドメインと結合する性質、あるいはＣＤ４０の細胞内ドメインと結合し、ＴＮＦＲ－２とは結合しない性質を有する、上記のアミノ酸配列と高いホモロジーを持つアミノ酸配列を有する物質は、ＴＲＡＦ５としての機能を有していると考えられる。したがって、上記アミノ酸配列もしくはその一部と高いホモロジー，例えば，約６０％，特に約８０％以上のホモロジーを持つアミノ酸配列を有し，マウスおよびヒトＴＲＡＦ５と同様の性質を示す物質も本発明のＴＲＡＦ５に含まれる。また、後述する治療薬への使用の場合、ヒトＴＲＡＦ５が好ましい。

該ＴＲＡＦ５は、後に記載する実施例に示されるように、ＲＩＮＧフィンガードメイン、Ｚｎフィンガードメイン、コイルドーコイルドメイン、ＴＲＡＦ－Ｃドメインからなる細胞内蛋白質である。

本発明は、従って、少なくとも、これらの各ドメインもしくはその一部を含むポリペプチド、及びそれらの結合したポリペプチドにも係わる。

ＲＩＮＧフィンガードメイン、Ｚｎフィンガードメイン、コイルドーコイルドメイン、ＴＲＡＦ－Ｃドメインは配列表の配列番号１に示したアミノ酸配列の各々４５－８４、１１０－２４９、２５１－４０３、及び４０４－５５８番目、ないし、配列表の配列番号４に示したアミノ酸配列の各々４５－８４、１１０－２４９、２５１－４０３、及び４０４

－５５７番目にあたる。しかしながら、それは上記ポリペプチドの１具体例にすぎず、各ドメインと同様の機能を有する限り、該アミノ酸配列において、アミノ酸の欠失、置換及び付加等によって、その一部が異なるものも、本発明のポリペプチドに含まれるものである。同様に、各ドメインの境目は、これに限定されるものでなく各ドメインの境目から、数個～十数個分Ｎ末端またはＣ末端、もしくはその両方にずれた領域を含むポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。

自己抗原に対する抗体を産生するＢ細胞は通常アポトーシスによって除かれているが、ヘルパーＴ細胞からの情報がＢ細胞に伝わると、これが解除され抗体産生へと向かう。したがって、本発明のＴＲＡＦ５およびその一部のポリペプチドは、ＣＤ４０のシグナル伝達を調節することによって、自己免疫疾患の治療薬として使用可能である。

また、Ｂ細胞は最初ＩｇＭ抗体を産生するが、ＣＤ４０シグナルにより抗体のクラススイッチが起こりＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥ抗体を産生するようになる。アレルギー患者はＩｇＥ抗体ができやすくなっており、その原因の一つとして抗体クラススイッチが過剰に亢進している可能性がある。したがって、本発明のＴＲＡＦ５およびその一部のポリペプチドは、ＣＤ４０シグナル伝達を調節することにより、ＩｇＥ産生の亢進を抑制し、アレルギーの治療薬に使用可能である。

さらに、ＣＤ４０シグナルは抗腫瘍活性、サイトカイン産生、Ｔ細胞活性化など様々な免疫反応や免疫疾患に関与している。したがって、本発明のＴＲＡＦ５およびその一部のポリペプチドは、ＣＤ４０シグナル伝達を調節することにより、抗細胞増殖作用を有する治療薬や様々な免疫疾患の治療薬として使用可能である。

尚、本発明のＴＲＡＦ５蛋白質及びポリペプチドを標的細胞内に導入する為には、リポソームに封入する等の方法を利用することができる。

本発明は、また、本発明のＴＲＡＦ５またはその一部のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むＤＮＡにも係わる。かかるＤＮＡは、染色体ＤＮＡ、ｃＤＮＡ等のいかなるＤＮＡをも包含するが、例えば、ｃＤＮＡであり得る。該ｃＤＮＡは、マウス精巣由来のｃＤＮＡライブラリーやＴ細胞リンパ腫ｃＤＮＡライブラリー、ないし、ヒトＢ細胞リンパ腫ｃＤＮＡライブラリー等より公知のコロニーハイブリダイゼイション法、プラークハイブリダイゼイション法やＰＣＲ法で得ることが出来る。Two-hybrid スクリーニング法（Mosialos G., et al., Cell 80, 389, 1995)によっても得ることができる。ｃＤＮＡライブラリーとしては、上述したものの他に、肺、胸腺、脾臓や腎臓から作製したライブラリー等を利用することも可能である。

本発明の塩基配列の具体例は、配列表の配列番号２および５に示されている。なお、後述の実施例に記載されているように、配列表の配列番号３および６のＤＮＡをプラスミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換したものが、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

この塩基配列以外にも、遺伝暗号の縮重を考慮して、化学合成や遺伝子工学的手法によって作製される、同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡも本発明に含まれる。

更に，すでに記載したように，本発明のＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドのアミノ酸配列と高いホモロジーを持つアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするＤＮＡは，上記の本発明のＤＮＡと互いにハイブリダイズすることが考えられる。

従って，配列番号２および５に示された塩基配列とハイストリージェンシーな条件下でハイブリダイズすることのできるＤＮＡ（およびその

断片）も本発明のＤＮＡに含まれる。

本発明のＤＮＡはＴＲＡＦ５やその一部のポリペプチドを遺伝子工学的に作製するために使用できる。また、本発明のＤＮＡを適当なベクターに組み込み、遺伝子治療にも使用できる。さらに、この塩基配列を基にトランスジェック動物、ノックアウト動物等を作製できる。

更に、本発明は、本発明ＤＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその誘導体に係わるものである。アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその誘導体は、本発明のＴＲＡＦ５又はその各ドメインを含むポリペプチドをコードするｍＲＮＡもしくはその一部分と相補的に結合し、それらｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳を阻害することによって、それらの発現を阻止するものである。

該アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその誘導体は、ＴＲＡＦ５をコードする塩基配列に結合するものに加え、その上流および下流のノンコーディング領域に結合するものも含まれる。

該アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその誘導体は、本発明のＤＮＡもしくはその一部に相補的な塩基配列を有する。すなわち，例えば，配列表の配列番号２、３、５および６に記載のＤＮＡもしくはその一部の相補鎖を有するが、アデニン（Ａ）に対する相補的塩基としてはチミン（Ｔ）のかわりにウラシル（Ｕ）であってもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体には、その立体構造や機能がオリゴヌクレオチドと類似するものすべてが含まれる。たとえば、オリゴヌクレオチドの３’末端もしくは５’末端に他の物質が結合した物や、オリゴヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか１つにおいて、置換や、修飾が生じた物質、天然には存在しないような、塩基、糖、リン酸を有する物や、糖－リン酸骨格以外の骨格（バックボーン）を有するもの等である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、公知方法で製造することができる（例えば、スタンレー　T．クルーク(Stanley T. Crooke）およびベルナルド　レブロー(Bernald Lebleu)編、in Antisense Research and Applications, ＣＲＣ出版、フロリダ１９９３年）。　メチルフオスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には、化学合成機（たとえばパーキンエルマージャパン（株）、３９４型）を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されたマニュアルに従って操作を行い、得られた合成産物を逆相ＨＰＬＣ法等により精製することによっても、目的のアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を得ることができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、ラジオアイソトープ，蛍光物質，酵素および発光物質等で標識して，試料中にＴＲＡＦ５およびその一部のポリペプチドをコードするＤＮＡ又はＲＮＡが存在するか否かを検出又は測定するために使用することが出来る。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を医薬用途に使用する場合には、医薬品として使用するのに適した純度のものを、薬理学的に許容されうる使用方法で使用することが好ましい。

例えば，本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体はＣＤ４０のシグナル伝達を調節することによって、ＩｇＥ産生の亢進を抑制し、アレルギーの治療薬に使用可能である。

また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体はＣＤ４０のシグナル伝達を調節することに

よって、抗細胞増殖作用を有する治療薬や自己免疫疾患等の様々な免疫疾患の治療薬として使用可能である。

上記の本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらを直接適当な溶媒に溶解もしくは懸濁して使用してもよいし、リポソーム中に封入したり、適当なベクターに組み込んだ形にして使用することができる。

更に、本発明は、該ＴＲＡＦ５もしくはその一部を認識する抗体に係わる。

該抗体には、ＴＲＡＦ５もしくはその一部を特異的に認識する抗体に加え、他のＴＲＡＦ－１、ＴＲＡＦ－２、ＣＲＡＦ１やそのポリペプチドと交叉反応するような抗体も含まれる。特定の動物種（例えばヒト）のＴＲＡＦ５もしくはその一部のみを認識する抗体、２つ以上の動物種のＴＲＡＦ５もしくはその一部を認識する抗体いずれもが含まれる。

該抗体の具体例は本発明のＴＲＡＦ５又はその各領域のポリペプチド又はそれらの断片を抗原として得られる抗体である。例えば、先述した本発明のＴＲＡＦ５をコードするＤＮＡで、適当な宿主を形質転換して、該ＴＲＡＦ５を生産させ、形質転換体もしくは培地からＴＲＡＦ５を精製して、それを抗原として後述の方法で本発明の抗体を得ることができる。また、ＴＲＡＦ５の一部のアミノ酸配列からなるポリペプチドを化学合成し、ＫＬＨ（キーホールリンペットヘモシアニン）等のキャリアと結合させ、それを抗原として後述の方法で本発明の抗体を得ることができる。抗原としてＴＲＡＦ５の一部を使用しても、全長を有するＴＲＡＦ５を認識する抗体を得ることができるし、マウスＴＲＡＦ５もしくはその一部を抗原として使用しても、ヒトをはじめとする他の動物種のＴＲＡＦ５もしくはその一部を認識する抗体を得ることが可能である。

本発明の抗体にはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれもが含まれる。また、該抗体は、いずれのクラス、サブクラスに属するものであってもよい。本発明の抗体は、それが、ＴＲＡＦ５もしくはその一部を認識する限り、キメラ抗体やヒト化抗体、Ｆ（ａｂ'）２やＦａｂ等の抗体フラグメントであり得る。

該抗体は、公知方法によって（例えば、免疫実験操作法、日本免疫学会編、日本免疫学会発行、参照）作製することができる。以下に、その一例を簡単に説明する。

まず、先述した本発明のＴＲＡＦ５をコードするＤＮＡで、適当な宿主を形質転換して、該ＴＲＡＦ５を生産させ、形質転換体の菌体もしくは培地から精製するか、ＴＲＡＦ５の一部のアミノ酸配列からなるポリペプチドを化学合成し、ＫＬＨ（キーホールリンペットヘモシアニン）等のキャリアと結合させ、精製して抗原を得る。抗原を、もしくはフロイントの完全アジュバント（ＦＣＡ）や不完全アジュバント（ＦＩＡ）等の適切なアジュバントと抗原とを、動物に接種し、２～４週間の間隔で免疫する。免疫後、採血を行い抗血清を得る。免疫する動物は、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ニワトリ、ヤギ、ブタ、ウシ等から、目的の抗体を産生しうる動物種を選択して使用する。ポリクローナル抗体は、得られた抗血清を精製することによって得る事が出来る。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせて行えば良い。

ヒト抗体は，in vitro sensitization法(Borrebaeck, C.A.K.J. Immunol.,Meth.,123, 157,1989参照）やＳＣＩＤマウスを用いた方法（工藤俊雄，組織培養，19，61-65,1993参照）等の方法で得ることが出来る。

モノクローナル抗体を得るには以下のように行う。すなわち、免疫し

た動物から脾細胞もしくはリンパ球等の抗体産生細胞を採取し、ポリエチレングリコール、センダイウイルス、電気パルス等を用いる公知方法によって、ミエローマ細胞株等と融合し、ハイブリドーマを作製する。その後、本発明のＴＲＡＦ５に結合する抗体を産生しているクローンを選択して培養する。選択されたクローンの培養上清から、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせてモノクローナル抗体を精製する。

また、上記方法で得られたハイブリドーマから該抗体をコードする遺伝子を単離し、それを利用して、キメラ抗体やヒト化抗体を作製することが可能である。例えば、マウス抗体の定常部をコードする遺伝子を、ヒト抗体の定常部をコードする遺伝子と置きかえ、再構成された遺伝子を動物細胞で発現させることによりキメラ抗体を得ることができる。また、ヒト化抗体は、相補性決定部位（ＣＤＲ）がマウス抗体のＣＤＲと置き換えられた抗体をコードするように遺伝子を再編成させ、それを動物細胞で発現させることにより得ることができる（Ｃａｒｔｅ等、Ｐｒｏ．Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　８９巻、４２８５頁．１９９２年）。

該抗体は、例えば、ＴＲＡＦ５が有するＣＤ４０のシグナル伝達を阻害する、所謂、中和抗体であり得る。該中和抗体は、ＴＲＡＦ５の活性を完全に抑制するもの、部分的に抑制するもののいずれもが含まれる。

本発明の抗体は、ラジオアイソトープ．蛍光物質．酵素および発光物質等で標識して．体液中や組織中に存在するＴＲＡＦ５もしくはそのデグラデーション産物を検出するために使用することができる。先述のように、ＴＲＡＦ５は、ＣＤ４０のシグナル伝達と係わっていると考えられるので、各組織や血中におけるＴＲＡＦ５の有無を検出できれば、疾

患の進行度や、予後の予測、治療効果の確認をすることが可能になる。該抗体は、また、ＴＲＡＦ５を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中のＴＲＡＦ５を検出するために使用することができる。

また、本発明の抗体のうち中和抗体は、ＣＤ４０のシグナル伝達を阻害あるいは調節することによって、自己免疫疾患等の様々な免疫疾患の治療薬として使用可能である。

更に、本発明の中和抗体はＣＤ４０のシグナル伝達を調節することによって、ＩｇＥ産生の亢進を抑制し、アレルギーの治療薬に使用可能である。

又、本発明は、上記ＤＮＡを含有するベクターに係わる。本発明のベクターは、上記ＤＮＡに加え、必要に応じて、当業者には公知のエンハンサーの配列、プロモーターの配列、リボゾーム結合配列、コピー数の増幅を目的として使用される塩基配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、他のポリペプチドをコードする塩基配列、ポリＡ付加配列、スプライシング配列、複製開始点、選択マーカーとなる遺伝子の塩基配列等を含んでいてもよい。

該ベクターは、ＴＲＡＦ５もしくはその一部をコードするＤＮＡを、当業者に公知の方法（例えばサムブルック J.(Sambrook J.)等、 Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク(New York), 1989年、参照）で、任意のベクターに組み込むことにより作製できる。ＴＲＡＦ５もしくはその一部をコードするＤＮＡの好適な例は、配列表の配列番号２および５に記載された塩基配列もしくは、その一部である。ベクターは、例えば，ｐＵＣ１１８，ｐＢＲ３２２，ｐＳＶ２－ｄｈｆｒ，ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ，ｐＨＩＬ－Ｓ１，λＺａｐII，λｇｔ１０，ｐＡｃ７００，ＹＲ

Ｐ１７．ｐＥＦ－ＢＯＳ．ｐＥＦＮ-ＩＩ 等のプラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等から適宜選択して使用しうる。該ベクターの好適な例は、ＴＲＡＦ５もしくはその一部をコードするＤＮＡに加え、発現に必要なプロモータ等の配列を有し、ＴＲＡＦ５もしくはその一部を発現しうる発現ベクターである。該発現ベクターは、ＴＲＡＦ５もしくはその一部を遺伝子工学的に生産するために使用することができる。

本発明は、上記ベクターを使用して形質転換させた形質転換体に係わる。該形質転換体は、適当な宿主細胞を公知方法（実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック1991年3 月20日発行、羊土社、参照）に従い、上記ベクターで形質転換することによって得ることができる。使用する宿主細胞は、大腸菌や枯草菌等の原核細胞、もしくは酵母や昆虫細胞、動物細胞等の真核細胞から適宜選択することができる。本発明の形質転換体の好適な例は、大腸菌または酵母、またはＣＨＯ細胞を宿主として得られた形質転換体であり、本発明のＴＲＡＦ５もしくはその一部を発現する形質転換体である。

本発明は更に、かかる形質転換体を培養する工程を含む、本発明のＴＲＡＦ５もしくはその一部を含むポリペプチドの製造方法に係わる。

該製造方法では、まず、本発明の形質転換体を培養し、必要に応じて、遺伝子の増幅や発現誘導をおこなう。形質転換体の培養や発現誘導は、公知方法（たとえば、「微生物実験法」社団法人日本生化学会編、株式会社東京化学同人、１９９２年、参照）に従って行うことができる。次に、培養混合物、すなわち培養上清もしくは細胞を回収し、それらを材料として、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、例えば．本発明の抗体を使用したアフィニティカラム等の各種クロマトグラフィー等の操作を行い、本発明のＴＲＡＦ５もしくはその一部を含むポリペプチドを精製

する。

当該製造方法において、本発明のポリペプチドは他のポリペプチドとの融合蛋白として形質転換体に生産させてもよい。当該蛋白質を他の蛋白質との融合蛋白として発現させた場合には、精製工程のいずれかのステップにおいて、融合蛋白質をブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理して当該蛋白質を切り出す操作を行う。

更に，本発明は，本発明のＴＲＡＦ５およびその一部のポリペプチドを又はそれらに対する抗体を使用して、それらに結合する物質，それらの活性を調節する物質、又はそれらの発現を調節する物質等のスクリーニング方法にも係わる．

たとえば、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドあるいはＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドを用いて、ＴＲＡＦ５もしくはその一部のポリペプチドに結合する物質やＴＲＡＦ５もしくはその一部のポリペプチドとＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドの結合を阻害する物質をスクリーニングすることもできる。たとえば公知方法（Ｉｓｈｉｄａ，Ｔ等、Ｐｒｏ．Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　９３巻、９４３７頁，１９９６年）に従って、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドとＦＲＡＧエピトープとの融合蛋白質を調製する。さらにＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドとＧＳＴとの融合蛋白質を調製する。これらの融合蛋白質とスクリーニング物質を混合させた後、公知方法（Ｉｓｈｉｄａ，Ｔ等、Ｐｒｏ．Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　９３巻、９４３７頁，１９９６年）に従って、ＴＲＡＦ５もしくはその一部のポリペプチドとＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドとの結合を阻害する物質を選択することができる。

さらに、Ｔｗｏ－Ｈｙｂｒｉｄスクリーニング法を応用して、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドとＣＤ４０もしくはその一部のポリペ

プチドの結合を阻害する物質を選択することができる。たとえば、公知方法（Ｉｓｈｉｄａ，Ｔ等、Ｐｒｏ．Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．９３巻、９４３７頁，１９９６年）に従って、ＣＤ４０細胞内ドメインをバクテリアのリプレッサーＬｅｘＡのＤＮＡ結合ドメインと融合する形で発現できる発現ベクターを作製する。さらにＴＲＡＦ５もしくはその一部のポリペプチドを酵母蛋白質ＧＡＬ４と融合する形で発現できる発現ベクターを作製する。これらの発現ベクターを公知方法（Ｉｓｈｉｄａ，Ｔ等、Ｐｒｏ．Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　９３巻、９４３７頁，１９９６年）に従って、酵母Ｌ４０株（Ｖｏｊｔｅｋ，Ａ．Ｂ．等，Ｃｅｌｌ，７４巻，２０５頁，１９９３年）に導入し、形質転換体を作製する。この形質転換体にスクリーニング物質を加え、公知方法（Ｉｓｈｉｄａ，Ｔ等、Ｐｒｏ．Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．９３巻、９４３７頁，１９９６年）に従って、ヒスチジン要求性およびβ－ガラクトシダーゼ活性を測定することにより、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドとＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドとの結合を阻害する物質を選択することができる。

また，公知方法（Ｉｓｈｉｄａ，Ｔ等、Ｐｒｏ．Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．，９３巻、９４３７頁，１９９６年）に従って、ＴＲＡＦ５のＮＦｋＢ活性化作用を指標にスクリーニングすることができる。たとえばヒトＪｕｒｋａｔ細胞あるいはヒト２９３Ｔ細胞にＴＲＡＦ５発現ベクターおよびＮＦ－ｋＢの活性化を評価するためのレポータープラスミドを導入する。この時スクリーニング物質を加え、レポーター遺伝子の発現を測定することによって、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドのＮＦｋＢ活性化作用を調節する物質を選択することができる。

さらに、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドの発現を調節する物質をスクリーニングすることができる。たとえばＢ細胞にスクリーニン

グ物質を加え、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドの発現を本発明のＴＲＡＦ５に対する抗体を用いて測定する方法等が挙げられる。

また、以下のような方法によっても，本発明のＴＲＡＦ５およびその一部のポリペプチドを使用して、それらに結合する物質，又はそれらの活性を調節する物質のスクリーニングをすることが出来る．

即ち，まず，ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドあるいはＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドを大量に生産して精製し、結晶化する。結晶化は公知方法（Ｃｒｙｓｔａｌｌｉｚａｔｉｏｉｎ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ．Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ．Ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ａ．ＤＵＣＲＵＩＸ ａｎｄ Ｒ．ＧＩＥＧＥ．ＩＲＬ ＰＲＥＳＳ ａｔ ＯＸＦＯＲＤ ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ ＰＲＥＳＳ．１９９２等）に従って行うことができる。

次に，公知方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．１１４，Ｄｉｆｆｒａｃｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ Ｐａｒｔ Ａ，Ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ｈａｒｏｌｄ Ｗ．Ｗｙｃｋｏｆｆ，Ｃ．Ｈ．Ｗ．Ｈｉｒｓ ａｎｄ Ｓｅｒｇｅ Ｎ．Ｔｉｍａｓｈｅｆｆ．ＡＣＡＤＥＭＩＣ ＰＲＥＳＳ，Ｉｎｃ．，１９８５等）に従い，Ｘ線解析を行い、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドの３次元構造あるいはＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドとＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドの結合体の３次元構造を知ることができる。

そして，こうして得られた３次元構造は，公知方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．１１５，Ｄｉｆｆｒａｃｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ Ｐａｒｔ Ｂ，Ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ｈａｒｏｌ

d W. Wyckoff, C. H. W. Hirs and Serge N. Timasheff. ACADEMIC PRESS. Inc., 1985等）に従い解析することができる.

そうして，このようにして得られるＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドの３次元構造あるいはＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドとＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドの結合体の３次元構造の解析データを用いて、公知方法（Ludi，MOLECULAR SIMULATIONS Inc.，又はDOCK. Kunts group, University of California San francisco等）に従い、ＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドに結合する物質やそれらとＣＤ４０もしくはその一部のポリペプチドとの結合を阻害する物質，更にはそれらの活性を阻害する物質等をスクリーニングしたり分子設計することができるのである.

従って，本発明は，こうしてスクリーニングして得られる新規な物質にも係わるものである.

上記のＴＲＡＦ５又はその一部のポリペプチドに結合する物質．それらの活性を阻害する物質、あるいはそれらの発現を調節する物質は．ＣＤ４０のシグナル伝達を調節することによって、抗細胞増殖作用を有する治療薬や自己免疫疾患等の様々な免疫疾患の治療薬として使用可能である。

また、このような物質はＣＤ４０のシグナル伝達を調節することによって、ＩｇＥ産生の亢進を抑制し、アレルギーの治療薬として使用可能である。

本発明の各種治療薬の有効成分は，その基本的な活性を失わせない限り，薬理学的に許容される化学修飾が施されたものや，塩を形成させたものであってもよい。例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸等の無

機酸との塩や、マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸等の有機酸との塩等である。

本発明の治療薬（医薬組成物）は、経口投与、経皮投与、静脈内投与、筋肉投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、及び経腸投与等のあらゆる投与経路で使用される。

本発明の治療薬は投与経路に応じて当業者には公知の定法に従って製剤化することができ、その際に薬理学的に許容される補助成分（賦形剤、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、界面活性剤、溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤、保存剤及び安定化剤等）を含むことが可能である。例えば、当該治療薬が注射剤である場合には、ゼラチンやヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等の安定化剤、Ｄ－マンニトール、Ｄ－ソルビトール、ブドウ糖等のアルコールや糖類、ポリソルベート８０（ＴＭ）等の界面活性化剤を含むこともできる。

本発明の治療薬（医薬組成物）のヒトに対する投与量は患者の病態、年齢、又は投与方法により異なるが、例えば，約０．０１～１００ｍｇ／ｋｇ／日、好ましくは、約０．１～１０ｍｇ／ｋｇ／日の用量で使用することができる。また，投与期間も特に制限されない。患者の病態等に応じて、適宜、点滴等で持続的に投与したり、適当な回数に分割して投与したり、又は単回投与したりすることができる。

図面の簡単な説明

図１は，ＴＲＡＦ５の各ドメインとＣＤ４０の細胞内ドメインと特異的に結合する３つのクローンを示す図である。

図２は，ＴＲＡＦ５とＣＲＡＦ１のアミノ配列との比較を示す図である。

図３は，各組織でのＴＲＡＦ５ｍＲＮＡのノーザンブロッティングの

電気泳動の結果を示す図である。

図４は，ＣＤ４０の細胞内ドメイン（２１６番目のＫから２７７番目のＱ）およびその変異体のアミノ酸配列を示す図である。

図５は，ＴＲＡＦ５とＣＤ４０の細胞内ドメインおよびその変異体とＧＳＴとの融合蛋白から得られた免疫複合体のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロッティングの電気泳動の結果を示す写真である。

図６は，Ｊｕｒｋａｔ細胞と２９３Ｔ細胞を用いたＴＲＡＦ５とＣＲＡＦ１のシグナル伝達活性を示す図である。

図７は，マウスＷＥＨＩ２３１Ｂ細胞の形質転換体のウエスタンブロッティングの電気泳動の結果を示す写真である。

図８は，ＦＡＣＳを用いたＣＤ２３の発現誘導抑制活性の結果を示す図である。

図９は，ヒトＢ細胞リンホーマ細胞株ＤａｕｄｉおよびＲａｊｉでのヒトＴＲＡＦ５ｍＲＮＡのノーザンブロッティングを示す電気泳動の写真である。

図１０は，２９３Ｔ細胞を用いたＴＲＡＦ５のシグナル伝達活性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の最良の実施の形態を示す実施例により、本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明を何等限定するものではない。

以下の記載において用いる略号は、当該技術分野における慣用略号に基づくものである。

なお、以下に示す実施例中の諸操作は、主にサムブルック等編〔モレ

キュラークローニング，ア　ラボラトリーマニュアル　第２版〕コールドスプリングハーバーラボラトリー，１９８９年；ハーロー・レイン著〔抗体　ア　ラボラトリーマニュアル〕コールドスプリングハーバー等を参考として実施した。

実施例１：マウスＴＲＡＦ５をコードするＤＮＡの取得

（１）スクリーニング

マウスＣＤ４０の細胞内ドメインと結合する蛋白質のｃＤＮＡをクローニングするため、ｔｗｏ－ｈｙｂｒｉｄ　スクリーニング法により、スクリーニングを行った。ｔｗｏ－ｈｙｂｒｉｄ　スクリーニング法とは２種の融合蛋白質間の複合体形成能を出芽酵母細胞内の転写の活性化を指標に検出する実験法である。

発現ベクターｐＡＣＴを用いて作製されたマウスＣ５７　Ｂｌａｃｋ　Ｋａｐｌａｎ　Ｔ細胞リンパ腫細胞株Ｖ１３　ｃＤＮＡ　ライブラリーをｃｌｏｎｔｅｃｈ社より購入した。このライブラリーは、ｃＤＮＡを酵母蛋白質ＧＡＬ４の活性ドメインとの融合蛋白質として、発現できる。

一方、マウスＣＤ４０の細胞内ドメインをバクテリアのリプレッサーであるＬｅｘＡのＤＮＡ結合ドメインと融合する形で発現できる発現ベクターを以下の手順に従い構築した。まず、マウスＣＤ４０細胞内ドメイン（Ｔｏｒｒｅｓ，Ｒ．Ｍ．ら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８巻，６２０－６２６頁，１９９２年：アミノ酸番号２１６のＬｙｓから３０５のＰｈｅまで）をコードするＤＮＡ断片を以下の手順に従い、ＰＣＲによって調製した。まずセンスプライマーとして5’－ＧＣＧＧＡＴＣＣＴＣＡＡＡＡＡＧＧＴＧＧＴＣＡＡＧＡＡＡＣＣＡＡＡＧ－3’、アンチセンスプライマーとして5’－ＧＣＧＴＣＧＡＣＴＣＡＡＡＡＧＧＴＣＡＧＣＡＡＧＣＡＧＣＣＡＴＣ－3’を合成した。次いでプライマ

一、鋳型としてマウスＷＥＨＩ－２３１　Ｂ細胞ｃＤＮＡ、およびＴａｑポリメラーゼとその反応試薬（東洋紡社製）を混合した。ＤＮＡサーマルサイクラー（パーキンエルマー社製）にて９５℃で１分間、５５℃で２分間、７２℃で３分間反応させ、この操作を３０サイクル行い２８０ｂｐ付近の増幅産物を回収した。ＢａｍＨＩとＳａｌＩで切断後、プラスミドｐＢＴＭ１１６（Ｂａｒｔｅｌ，Ｐ．Ｌ．ら，ｉｎ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｈａｒｔｌｅｙ，Ｄ．Ａ．ｅｄ．：１５３－１７９頁，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，１９９３年）のＢａｍＨＩ－ＳａｌＩ制限酵素サイトに挿入した。構築したプラスミドをｐＢＴＭ４０ｃｙｔと命名した。

酵母Ｌ４０株（Ｖｏｊｔｅｋ，Ａ．Ｂ．ら，Ｃｅｌｌ，７４巻，２０５－２１４頁，１９９３年）はＨＩＳ３及びｌａｃＺレポーター遺伝子がゲノムに組み込まれており、細胞内でＬｅＸＡ結合ドメイン／ＣＤ４０細胞内ドメイン融合蛋白質とＧＡＬ４活性ドメイン／ｃＤＮＡ発現産物融合蛋白質が結合すると、ヒスチジンが欠損する培地で生育できる様になり、かつβ－ガラクトシダーゼ活性が陽性になる性質をもつ。

ｐＢＴＭ４０ｃｙｔを酵母Ｌ４０株に酢酸リチウム法により導入した。そして、ＬｅｘＡ結合ドメイン／ＣＤ４０細胞内ドメイン融合蛋白質が発現している形質転換体を得た。この形質転換体をＬ４０Ｃ４０と命名した。先述のｃＤＮＡライブラリー　２×１０^{6}クローンを酢酸リチウム法により、形質転換体Ｌ４０Ｃ４０に導入し、ヒスチジン欠損培地にまいた。３０℃、７日間培養後、出現したクローンを単離した。次にこれらのクローンのβ－ガラクトシダーゼ活性の検出を前述のｃＤＮＡライブラリー添付のプロトコールに従い実施した。そして２０分間のイ

ンキュベーションでβ－ガラクトシダーゼ活性が検出できた７２クローンを選択した。

これらのクローンから、すでに同様のスクリーニング系で選択できる事が知られているＣＲＡＦ１あるいはＴＲＡＦ２のｃＤＮＡクローンを除外するため、各々の酵母コロニーからプラスミドを抽出し、ＣＲＡＦ１そしてＴＲＡＦ２　ｃＤＮＡをプローブとしたサザーンブロッティングを実施した。その結果、１０クローンは２つのプローブのいずれともハイブリダイズしなかった。これらのクローンより、ｃＤＮＡを含むプラスミドを回収した。これらのプラスミドをｐＢＴＭ４０ｃｙｔあるいはＬｅＸＡ結合ドメイン／ヒトｌａｍｉｎ　Ｃ融合蛋白質発現ベクターｐＢＴＭＬａｍｉｎ（Ｖｏｊｔｅｋ，Ａ．Ｂ．ら，Ｃｅｌｌ，７４巻，２０５－２１４頁，１９９３年参照）と共に、酵母Ｌ４０株に酢酸リチウム法により導入した。そしてｐＢＴＭ４０ｃｙｔと共に導入した時のみ、ヒスチジン欠損培地で生育し、かつ先述の条件下でβ－ガラクトシダーゼ活性が検出できる４クローンを得た。この内、３クローンは（Ｃ４０－３、Ｃ４０－６、Ｃ４０－７２）は、同じタンパク質の一部分をコードするｃＤＮＡを有していた（図１）。

３クローンの内、最も長い約１ｋｂｐのｃＤＮＡ断片を有していたＣ４０－３のｃＤＮＡ断片をプローブとして、λＺＡＰＩＩベクター（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を用いて公知の方法に従い作製したマウス精巣ｃＤＮＡライブラリーをプラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。２クローンが得られたので、ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｅｘｃｉｓｉｏｎ法によりそのｃＤＮＡ断片が挿入されたプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔを回収した。そして、ＢｃａＢｅｓｔシークエンスシステム（宝酒造社製）に従ってそのｃＤＮＡ断片の塩基配列を決定した。最も長いｃＤＮＡ断片を有するクローンは２１０５塩基のｃＤＮＡ断片

を有していた（配列表の配列番号３）。このｃＤＮＡがｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔに挿入されたプラスミドをｐＢＳＣＲＡＦ２（ｐＢＳＴＲＡＦ５）と命名した。

公知の方法で、大腸菌株ＮＭ５２２をｐＢＳＣＲＡＦ２（ｐＢＳＴＲＡＦ５）で形質転換し、得られた形質転換体大腸菌ＮＭ５２２（ｐＢＳＣＲＡＦ２）を１９９６年３月２７日付けで，日本国茨城県つくば市東１丁目１番３号にある通産省工業技術院生命工学技術研究所に寄託した（受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－１５５３１）。その後，該菌株は，１９９７年３月６日付けでブダペスト条約に基づく国際寄託に移管し，受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－５８５６が付されている。

（２）ＴＲＡＦ５の構造の解析

上記（１）で決定したＤＮＡ配列をもとにＴＲＡＦ５の構造を解析した。その結果、ＴＲＡＦ５は５５８アミノ酸残基から成る蛋白質からなると推定された（配列表の配列番号１）。ＰＩＲデータベースを用いて相同性検索を実施したところ、図２に示す様にＣＲＡＦ１と最も高い相同性を示した。特に、ＴＲＡＦ５のＣ末端領域には、ＴＲＡＦ－Ｃドメインが存在していた（図２）。ＴＲＡＦ－Ｃドメインは、ＴＮＦＲ－２の細胞内ドメインと結合することが知られているＴＲＡＦ１、ＴＲＡＦ２や、先述のＣＲＡＦ１に共通に存在するモチーフであり、他のタンパク質との相互作用に関与することが知られている。ＴＲＡＦ－Ｃドメインに加え、ＴＲＡＦ５は、Ｎ末端から順にＲＩＮＧフィンガードメイン、５つのＺｎフィンガードメインおよびコイルドーコイルドメインを有していた（図１）。

（３）ノーザンブロッティング

種々の組織の全ＲＮＡはグアニジンイソチアシネート／アシッドフェノール法（Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ，Ｐ．およびＳａｃｃｈｉ，Ｎ．，

Anal. Biochem.，162巻，156－159頁，1987年）によって調製し、続いて、オリゴ（dT）ラテックス（宝酒造社製）を用いてポリ（A）$^+$ RNAを精製した。7μgのポリ（A）$^+$ RNAを6．6%のホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、ナイロン膜（アマシャム社製）にブロッティングした。プローブはC40－3のcDNA断片を^{32}Pにて標識する事により、作製した。前述のナイロン膜をプローブとハイブリダイゼーションバッファー（0．2M NaHPO$_4$［pH7．2］，1mM EDTA，1%（W／V）BSA、7%（W／V）SDS）中、65℃でインキュベーションした。フィルターは、最終的に0．5×SSC／0．2%（W／V）SDSで、65℃、30分間洗浄し、オートラジオグラフィーを実施した。結果を図3に示した。

TRAF5 mRNAは、肺で強く、胸腺、脾、腎で中程度に、脳、肝で弱く検出された。しかし、骨格筋、心、小腸、精巣では、ノーザン解析によっては、TRAF5 mRNAは検出されなかった。TRAF5 mRNAは約2．2kbであり、得られたTRAF5 cDNAはほぼ完全長である事が確証できた。

実施例2：TRAF5との結合に必要なヒトCD40領域の決定

ヒトCD40細胞内ドメイン（Stamenkovic，I．ら，EMBO J．，8巻，1403－1410頁，1989年：図4）の変異体をコードするプラスミドの作製はKunkel（Kunkel，T．A．Proc．Natl．Acad．Sci．USA．82巻，488－492頁，1985年）の方法に従った。ヒトCD40細胞内ドメイン、その変異体をコードする各DNAおよびヒトTNFR－2細胞内ドメイン（Smith，C．A．ら，Science，248巻，1019－1023頁，1990年：アミノ酸番号288のLysから46

１のＳｅｒまで）をコードする各ＤＮＡはＧＳＴ融合蛋白質発現ベクターｐＧＥＸ２Ｔ（ファルマシアＬＫＢ社製）にサブクローンし、得られたプラスミドによって大腸菌ＢＬ２１を形質転換した。各発現ベクターによってコードされるヒトＣＤ４０細胞内ドメインの変異部位を図４に示した。

ＧＳＴ、ＧＳＴ／ＣＤ４０細胞内ドメインあるいはその変異体の融合蛋白質および、ＧＳＴ／ＴＮＦＲ－２融合蛋白質（ＧＳＴ－ＴＮＦＲＩＩ）は、Ｓｍｉｔｈらの方法（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｂ．およびＪｏｈｎｓｏｎ，Ｋ．Ｓ．，Ｇｅｎｅ　６７巻，３１－４０頁，１９８８年）に従い調製し、得られた各蛋白質をグルタチオンアガロースビースに０．２ｍｇ／ｍｌで固定化した。ビーズ溶液２μｌを、１２．５％ポリアクリルアミド／ＳＤＳ　ゲルに電気泳動し、クマーシーブリリアントブルーＲ－２５０にて染色した。結果を図５の下の部分に示した。

Ｃ４０－３　ｃＤＮＡによってコードされる蛋白質のＮ末端に、ＦＬＡＧエピトープ（イーストマン　コダック社製参照）が付加した蛋白質（ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３）をコードするＤＮＡを、発現ベクターｐＭＥ１８Ｓ（実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ４、遺伝子導入と発現、解析法、１９９４年４月２０日発行、羊土社、参照）のＳＲαプロモーター下流に挿入し、発現ベクターｐＭＥ－ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３を作製した。

１０⁶のＣＯＳ７細胞に１０μｇのｐＭＥ－ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３をトランスフェクションした。発現ベクター導入３６時間後、細胞を回収し、ＴＮＥバッファー（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．８）、１％（Ｗ／Ｖ）ＮＰ－４０、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　ｉｏｄｏａｃｅｔｏａｍｉｄｅ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１０μｇ／ｍｌ　ａｐｒｏｔｉｎｉｎ）によって溶解した後、遠心した。上清の半量を、上述の

１μｇの蛋白質を固定化したグルタチオンアガロースビーズと４℃で１時間インキュベートした後、ビーズを洗浄し、０．１％ＳＤＳ存在下で、煮沸した。続いて抗ＦＬＡＧ抗体Ｍ２（イーストマン　コダック社製）を用いて免疫沈降し、免疫複合物を１２．５％ポリアクリルアミド／ＳＤＳゲルにて電気泳動した。そして抗ＦＬＡＧ抗体Ｍ２とアルカリホスファターゼ標識した抗マウスＩｇＧ抗体を用いて、公知の方法に従いウエスタンブロッティングした。その結果を図５の上の部分に示す。

ＧＳＴ／ＣＤ４０の細胞内ドメイン融合蛋白質（ＧＳＴ－ＷＴ）はＦＬＡＧ－Ｃ４０－３と効率良く結合した。陰性コントロールとして用いたＧＳＴ蛋白質は、ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３とは結合しないため、本実験系の結合特異性が保証できた。一方、ＣＤ４０の２５４番目のＴｈｒをＡｌａに変異させた変異体（ＧＳＴ－ＴＡ：図４）のＦＬＡＧ－Ｃ４０－３への結合能は、ＧＳＴ－ＷＴに比べ著しく減少した。この変異によりヒトＣＤ４０が介する増殖阻害シグナルが伝達しなくなることがすでに知られている（Ｉｎｕｉ．Ｓ．ら，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０巻，１７４７－１７５３頁，１９９０年）。他のヒトＣＤ４０細胞内ドメインの種々欠失変異体については、ＧＳＴ－△２７０（図４のアミノ酸番号２７０のＡｒｇから２７７のＧｌｎまでを欠失させたもの）がＧＳＴ－ＷＴと同等のＦＬＡＧ－Ｃ４０－３への結合を示し、ＧＳＴ－△２３０（図４のアミノ酸番号２３０のＬｙｓから２７７のＧｌｎまでを欠失させたもの）とＧＳＴ－△２４６（図４のアミノ酸番号２４６のＡｓｎから２７７のＧｌｎまでを欠失させたもの）は、ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３にほとんど結合できなかった。ＧＳＴ－△２３０とＧＳＴ－△２４６に比べ、ＧＳＴ－△２３０－２４６（図４のアミノ酸番号２３０のＬｙｓから２４５のＳｅｒまでを欠失させたもの）はわずかにＦＬＡＧ－Ｃ４０－３と結合した。さらに、ＧＳＴ－△２３９－２４６（図４の

アミノ酸番号２３９のＰｒｏから２４５のＳｅｒまでを欠失させたもの）及びＧＳＴ－△２２０－２３９（図４のアミノ酸番号２２０のＬｙｓから２３８のＰｈｅまでを欠失させたもの）はＧＳＴ－ＷＴと同等の結合活性を示した。

以上の結果よりヒトＣＤ４０の図４のアミノ酸番号２４６のＡｓｎと２６９のＳｅｒの間の領域はＴＲＡＦ５との結合に必要ではあるが、十分ではなく、図４のアミノ酸番号２３０のＬｙｓと２３９のＰｒｏの間の領域あるいは、図４のアミノ酸番号２３９のＰｒｏと２４６のＡｓｎの間の領域がＴＲＡＦ５との効率的な結合には加えて必要である事がわかった。ＣＤ４０の細胞内ドメインの３次構造は未だ良く解明できていないが、ＴＲＡＦ５は図４のアミノ酸番号２３０のＬｙｓから２６９のＳｅｒの間の領域にわたる構造を認識すると思われる。又、ＣＲＡＦ１はＴＮＦＲ－２と弱く結合できると報告されている（Ｍｏｓｉａｌｏｓ．Ｇ．ら，Ｃｅｌｌ，８０巻，３８９－３９９頁，１９９５年）。しかし、ＧＳＴ－ＴＮＦＲＩＩ（ＴＮＦＲ－２）は、ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３に結合しないことが図５の上の部分よりわかる。このことより、ＴＲＡＦ５はＴＮＦＲ－２と結合しないことがわかった。

実施例３：ＴＲＡＦ５のシグナル伝達活性の確認

（１）ＮＦｋＢの活性化作用の確認

ヒトＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で培養した。又、ヒト２９３Ｔ　腎細胞を１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭで培養した。

ＣＲＡＦ１　ｃＤＮＡは、以下の手順に従い、ＰＣＲによって調製した。まずセンスプライマーとして5’－ＣＴＣＣＴＣＧＡＧＡＴＧＧＡＧＴＣＧＡＧＴＡＡＡＡＡＧＡＴＧＧＡＣ－3’、アンチセンスプライマーとして5’－ＣＴＴＡＣＴＡＧＴＴＣＡＧＧＧＡＴＣＧＧＧＣＡＧ

ＡＴＣＣＧＡＡＧＴ－３’を合成した。次いで、プライマー、鋳型としてマウス脾ｃＤＮＡ、およびＴａｑポリメラーゼとその反応試薬（東洋紡社製）を混合した。ＤＮＡサーマルサイクラー（パーキンエルマー社製）にて９５℃で１分間、５５℃で２分間、７２℃で３分間反応させ、この操作を３０サイクル行い、１５００ｂｐ付近の増幅産物を回収した。ＸｈｏＩとＳｐｅＩにて切断後、発現ベクターｐＭＥ１８ＳのＸｈｏＩ－ＳｐｅＩ制限酵素部位に挿入した。得られたプラスミドをｐＭＥ－ＣＲＡＦ１と命名した。又、ＴＲＡＦ５　ｃＤＮＡを発現ベクターｐＭＥ１８ＳのＥｃｏＲＩ－ＮｏｔＩ制限酵素部位に挿入した。得られたプラスミドをｐＭＥ－ＴＲＡＦ５（ｐＭＥ－ＣＲＡＦ２）と命名した。

転写因子ＮＦ－ｋＢの活性を評価するためのレポータープラスミドとして、ＮＦ－ｋＢの結合部位であるｋＢ部位に依存してＣＡＴが発現する［ｋＢ］３ＴＫ－ＣＡＴ（Ｉｎｏｕｅ，Ｊ．ら，　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，８８巻，３７１５－３７１９頁，１９９１年）を用いた。さらに、ＣＡＴ発現のｋＢ特異性を確認するために、陰性コントロールレポータープラスミドとしてｋＢ部位が変異した［ｋＢＭ］３ＴＫ－ＣＡＴ（Ｉｎｏｕｅ，Ｊ．ら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，８８巻，３７１５－３７１９頁，１９９１年）を用いた。又、ＤＮＡの細胞導入効率を評価するためのレポータープラスミドとして、β－アクチン　プロモーターの制御下にβ－ガラクトシダーゼを発現するβ－ａｃｔｉｎ－β－ｇａｌを用いた。

ヒトＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞への発現プラスミド導入は、以下の手順によって実施した。１μｇのレポータープラスミド（［ｋＢ］３ＴＫ－ＣＡＴあるいは［ｋＢＭ］３ＴＫ－ＣＡＴ）、１μｇのβ－ａｃｔｉｎ－β－ｇａｌおよび１．５μｇもしくは３μｇのｐＭＥ－ＣＲＡＦ１あるいはｐＭＥ－ＴＲＡＦ５を混合した。そしてＤＮＡの全量が５μｇになる様

にｐＭＥ１８Ｓを添加した。そしてＤＥＡＥ－デキストラン法により、２×１０⁶の細胞へトランスフェクションした。

ヒト２９３Ｔ　腎細胞への発現プラスミド導入は、以下の手順に従い実施した。

１μｇのレポータープラスミド（［ｋＢ］₃ＴＫ－ＡＴあるいは［ｋＢＭ］₃ＴＫ－ＣＡＴ）、１μｇのβ－ａｃｔｉｎ－β－ｇａｌおよび１０μｇもしくは２０μｇのｐＭＥ－ＣＲＡＦ１あるいはｐＭＥ－ＴＲＡＦ５を混合した。そして、ＤＮＡの全量が２２μｇになる様にｐＭＥ１８Ｓを添加した。そして、リン酸カルシウム法により、１０⁶の細胞にトランスフェクションした。

トランスフェクション４８時間後、細胞を回収し、凍結融解後遠心することにより、細胞抽出液を調製した。

トランスフェクション効率は、β－ガラクトシダーゼ活性を常法（Ｈｅｒｂｏｍｅｌ．Ｐ．ら，Ｃｅｌｌ，３９巻，６５３－６６２頁，１９８４年）に従い測定することにより標準化した。

ＣＡＴ活性は常法（Ｇｏｒｍａｎ，Ｃ．Ｍ．ら，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，２巻，１０４４－１０５１頁，１９８２年）に従い、３７℃、１時間の反応時間で実施した。その結果を図６に示した。

ヒトＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞（Ａ）では、ＴＲＡＦ５はｋＢ部位依存性の転写を、用量依存的に活性化した。ＣＲＡＦ１にはその様な活性は観られなかった。ヒト２９３Ｔ　腎細胞（Ｂ）でもＴＲＡＦ５はＮＦｋＢを活性化した。しかし、ヒトＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞で観られた程、用量依存性が顕著ではなかった。これは、２９３Ｔ細胞では何ら刺激がなくても、すでにＮＦｋＢが活性化しているためである。このすでに活性化されているＮＦｋＢは、ＣＲＡＦ１が過剰発現することにより抑制された。すなわちＴＲＡＦ５とＣＲＡＦ１は、その過剰発現によるＮＦｋＢ

の活性化に対する影響に関して、相反する活性を示した。

（２）ドミナントネガティブ変異体のＣＤ２３発現誘導抑制活性の確認

ｐＭＥ－ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３とプロマイシン耐性遺伝子発現プラスミドｐＡｐｕｒｏ（Ｔａｋａｔａ，Ｍ．ら，ＥＭＢＯ　Ｊ．，１３巻，１３４１－１３４９頁，１９９４年）を共にマウスＷＥＨＩ－２３１　Ｂ細胞にトランスフェクションし、０．５μｇ／ｍｌ　プロマイシンの存在下でプロマイシン耐性株を選択する事により、形質転換体を得た。

形質転換体の内、＃２７，＃３０，＃４１，＃３３，＃３９，＃５７および親株であるＷＥＨＩ－２３１　Ｂ細胞について、実施例２と同様にウエスタンブロッティングによって、ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３の発現を確認した。その結果、＃３３，＃３９，＃５７は、ＦＬＡＧ－Ｃ４０－３の発現が確認できた（図７）。一方、＃２７，＃３０，＃４１およびＷＥＨＩ－２３１　Ｂ細胞ではＦＬＡＧ－Ｃ４０－３の発現が確認できなかった（図７）。又、すべての形質転換体は正常レベルのマウスＣＤ４０を発現していた。

これらの形質転換体をマウスＣＤ４０Ｌ－ＣＤ８キメラ蛋白質（Ｌａｎｅ，Ｐ．ら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７７巻，１２０９－１２１３頁，１９９３年）で４８時間刺激した。無刺激コントロールとして、刺激剤の代わりに培地を添加した。その後、ＦＩＴＣ標識抗ＣＤ２３抗体を用いて、細胞を染色し、ＦＡＣＳｃａｎ（ベクトン　ディキンソン社製）の説明書に従い、ＬｙｓｉｓＩＩプログラムを用いて解析した。その結果を図８に示す。

形質転換体＃３３，＃３９，＃５７では、ほとんどＣＤ２３の発現が誘導されなかった。一方、親株および＃２７，＃３０，＃４１では、Ｃ

Ｄ４０Ｌ－ＣＤ８キメラ蛋白質の刺激により、ＣＤ２３の発現が誘導されていた。Ｃ４０－３のｃＤＮＡによってコードされている蛋白質は、ＴＲＡＦ５のＮ末端領域が欠損したものであり、ＲＩＮＧ　フィンガードメインとＺｎフィンガードメインの一部を欠損しているが、ＴＲＡＦ－Ｃドメインは有している（図１）。この蛋白質は、ＣＤ４０シグナルを介して誘導されるＣＤ２３の発現に対して、ドミナントネガティブ変異体として機能する事がわかった。

実施例４：ヒトＴＲＡＦ５をコードするＤＮＡの取得

（１）スクリーニング

実施例１で取得したマウスＴＲＡＦ５ｃＤＮＡ断片をプローブとして、バーキットＢ細胞リンホーマ細胞株Ｄａｕｄｉ　ｃＤＮＡライブラリー（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）をプラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションバッファー（０．２Ｍ　ＮａＨＰＯ４［ｐＨ７．２］，１ｍＭ　ＥＤＴＡ．１％（Ｗ／Ｖ）ＢＳＡ、７％（Ｗ／Ｖ）ＳＤＳ）中、５０℃でインキュベーションすることにより行った。フィルターは、最終的に１×ＳＳＣ／０．１％（Ｗ／Ｖ）ＳＤＳで、５０℃、３０分間洗浄し、オートラジオグラフィーを実施した。２クローンが得られたので、そのｃＤＮＡ断片をプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔにサブクローニングした。そして、ＡＢＩ　ＰＲＩＺＭサイクルシークエンスシステム（パーキンエルマー社製）に従ってそのｃＤＮＡ断片の塩基配列を決定した。最も長いｃＤＮＡ断片を有するクローンは３９９３塩基のｃＤＮＡ断片を有していた（配列表の配列番号６）。このｃＤＮＡがｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔに挿入されたプラスミドをｐＢＳｈＴＲＡＦ５と命名した。

公知の方法で、大腸菌株ＪＭ１０９をｐＢＳｈＴＲＡＦ５で形質転換

し、得られた形質転換体大腸菌ＪＭ１０９（ｐＢＳｈＴＲＡＦ５）を１９９６年１２月１０日付けで，日本国茨城県つくば市東１丁目１番３号にある通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した（受託番号ＦＥＲＭＰ－１５９９３）。その後，該菌株は，１９９７年３月６日付けでブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され，受託番号ＦＥＲＭＢＰ－５８５７が付されている。

（２）ヒトＴＲＡＦ５の構造解析

上記（１）で決定したＤＮＡ配列をもとにヒトＴＲＡＦ５の構造を解析した。その結果、ヒトＴＲＡＦ５は５５７アミノ酸残基から成る蛋白質からなると推定された（配列表の配列番号４）。ヒトＴＲＡＦ５はマウスＴＲＡＦ５とアミノ酸配列で８０％、ＤＮＡ塩基配列で８２％の相同性を有していた。ヒトＴＲＡＦ５はマウスＴＲＡＦ５と同様、Ｎ末端から順にＲＩＮＧフィンガードメイン、５つのＺｎフィンガードメイン、コイルドーコイルドメインおよびＴＲＡＦ－Ｃドメインを有していた。

（３）ノーザンブロッティング

ヒトＢ細胞リンホーマ細胞株ＤａｕｄｉおよびＲａｊｉのポリ（Ａ）$^+$ ＲＮＡを実施例１と同様の方法により調整した。１２μｇのポリ（Ａ）$^+$ ＲＮＡを６．６％のホルムアルデヒドを含む１％アガロースゲルを用いて電気泳動し、ナイロン膜（アマシャム社製）にブロッティングした。プローブは以下のように作製した。まずセンスプライマーとして５’－ＧＣＡＧＣＡＧＣＣＧＣＧＣＣＴＧＣＡＧＡＣＣＧＧＣ－３’アンチセンスプライマーとして５’－ＡＴＣＣＡＧＧＡＧＣＡＴＴＧＣＴＧＣＡＡＴＡＴＡＣ－３’を合成し、次いで、プライマー、鋳型としてヒトＴＲＡＦ５ｃＤＮＡ、およびＴａｑポリメラーゼとその反応試薬（東洋紡社製）を混合した。ＤＮＡサーマルサイクラー（パーキンエルマー

社製）にて９５℃で１分間、５５℃で２分間、７２℃で３分間反応させ、この操作を３０サイクル行い、５００ｂｐ付近の増幅産物を回収した。このＤＮＡ断片を^{32}Ｐにて標識した。前述のナイロン膜をプローブとハイブリダイゼーションバッファー（０．２Ｍ ＮａＨＰＯ$_4$［ｐＨ７．２］，１ｍＭ ＥＤＴＡ，１％（Ｗ／Ｖ）ＢＳＡ、７％（Ｗ／Ｖ）ＳＤＳ）中、６５℃でインキュベーションした。フィルターは、最終的に０．５×ＳＳＣ／０．２％（Ｗ／Ｖ）ＳＤＳで、６５℃、３０分間洗浄し、オートラジオグラフィーを実施した。結果を図９に示した。

ヒトＴＲＡＦ５ ｍＲＮＡは約４～５ｋｂであり、得られたＴＲＡＦ５ ｃＤＮＡはほぼ完全長である事が確証できた。

実施例５：ＴＲＡＦ５のシグナル伝達活性の確認

（１）ＮＦｋＢの活性化作用の確認

実施例３と同様の方法によって、ヒトＴＲＡＦ５のＮＦｋＢの活性化作用を確認した。１μｇのレポータープラスミド（［ｋＢ］$_3$Ｔ Ｋ－ＣＡＴあるいは［ｋＢＭ］$_3$Ｔ Ｋ－ＣＡＴ）、１μｇのβ－ａｃｔｉｎ－β－ｇａｌおよび２、４、８μｇのｐＭＥ－ＦＬＡＧ－ｈＴＲＡＦ５を混合した。対照としてｐＭＥ－ＦＬＡＧ－ｈＴＲＡＦ５を添加しないものを用いた。そしてＤＮＡの全量が１０μｇになる様にｐＭＥ１８Ｓを添加した。そしてＣａＰＯ$_4$法により、２×１０^{6}の２９３Ｔ細胞へトランスフェクションした。トランスフェクション４８時間後、細胞を回収し、凍結融解後遠心する事により細胞抽出液を調製し、ＣＡＴ活性を測定した。結果を図１０に示した。

２９３Ｔ細胞では、ＴＲＡＦ５はｋＢ部位依存性の転写を用量依存的に活性化した。

〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：558

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala His Ser Glu Glu Gln Ala Ala Val Pro Cys Ala Phe Ile
1 5 10 15

Arg Gln Asn Ser Gly Asn Ser Ile Ser Leu Asp Phe Glu Pro Asp
20 25 30

Thr Glu Tyr Gln Phe Val Glu Gln Leu Glu Glu Arg Tyr Lys Cys
35 40 45

Ala Phe Cys His Ser Val Leu His Asn Pro His Gln Thr Gly Cys
50 55 60

Gly His Arg Phe Cys Gln Gln Cys Ile Arg Ser Leu Arg Glu Leu
65 70 75

Asn Ser Val Pro Ile Cys Pro Val Asp Lys Glu Val Ile Lys Pro
80 85 90

Gln Glu Val Phe Lys Asp Asn Cys Cys Lys Arg Glu Val Leu Asn
95 100 105

Leu His Val Tyr Cys Lys Asn Ala Pro Gly Cys Asn Ala Arg Ile
110 115 120

Ile Leu Gly Arg Phe Gln Asp His Leu Gln His Cys Ser Phe Gln
125 130 135

Ala Val Pro Cys Pro Asn Glu Ser Cys Arg Glu Ala Met Leu Arg
140 145 150

Lys Asp Val Lys Glu His Leu Ser Ala Tyr Cys Arg Phe Arg Glu
155 160 165

Glu Lys Cys Leu Tyr Cys Lys Arg Asp Ile Val Val Thr Asn Leu

170 175 180

Gln Asp His Glu Glu Asn Ser Cys Pro Ala Tyr Pro Val Ser Cys

185 190 195

Pro Asn Arg Cys Val Gln Thr Ile Pro Arg Ala Arg Val Asn Glu

200 205 210

His Leu Thr Val Cys Pro Glu Ala Glu Gln Asp Cys Pro Phe Lys

215 220 225

His Tyr Gly Cys Thr Val Lys Gly Lys Arg Gly Asn Leu Leu Glu

230 235 240

His Glu Arg Ala Ala Leu Gln Asp His Met Leu Leu Val Leu Glu

245 250 255

Lys Asn Tyr Gln Leu Glu Gln Arg Ile Ser Asp Leu Tyr Gln Ser

260 265 270

Leu Glu Gln Lys Glu Ser Lys Ile Gln Gln Leu Ala Glu Thr Val

275 280 285

Lys Lys Phe Glu Lys Glu Leu Lys Gln Phe Thr Gln Met Phe Gly

290 295 300

Arg Asn Gly Thr Phe Leu Ser Asn Val Gln Ala Leu Thr Ser His

305 310 315

Thr Asp Lys Ser Ala Trp Leu Glu Ala Gln Val Arg Gln Leu Leu

320 325 330

Gln Ile Val Asn Gln Gln Pro Ser Arg Leu Asp Leu Arg Ser Leu

335 340 345

Val Asp Ala Val Asp Ser Val Lys Gln Arg Ile Thr Gln Leu Glu

350 355 360

Ala Ser Asp Gln Arg Leu Val Leu Leu Glu Gly Glu Thr Ser Lys

365 370 375

His Asp Ala His Ile Asn Ile His Lys Ala Gln Leu Asn Lys Asn

380 385 390

Glu Glu Arg Phe Lys Gln Leu Glu Gly Ala Cys Tyr Ser Gly Lys
395 400 405

Leu Ile Trp Lys Val Thr Asp Tyr Arg Val Lys Lys Arg Glu Ala
410 415 420

Val Glu Gly His Thr Val Ser Val Phe Ser Gln Pro Phe Tyr Thr
425 430 435

Ser Arg Cys Gly Tyr Arg Leu Cys Ala Arg Ala Tyr Leu Asn Gly
440 445 450

Asp Gly Ser Gly Lys Gly Thr His Leu Ser Leu Tyr Phe Val Val
455 460 465

Met Arg Gly Glu Phe Asp Ser Leu Leu Gln Trp Pro Phe Arg Gln
470 475 480

Arg Val Thr Leu Met Leu Leu Asp Gln Ser Gly Lys Lys Asn His
485 490 495

Ile Val Glu Thr Phe Lys Ala Asp Pro Asn Ser Ser Ser Phe Lys
500 505 510

Arg Pro Asp Gly Glu Met Asn Ile Ala Ser Gly Cys Pro Arg Phe
515 520 525

Val Ser His Ser Thr Leu Glu Asn Ser Lys Asn Thr Tyr Ile Lys
530 535 540

Asp Asp Thr Leu Phe Leu Lys Val Ala Val Asp Leu Thr Asp Leu
545 550 555

Glu Asp Leu
558

配列番号：2

配列の長さ：１６７４

配列の型：核酸

配列の種類：ｃＤＮＡ　ｔｏ　ｍＲＮＡ

起源

生物名：マウス

配列

```
ATG GCT CAT TCG GAG GAG CAA GCG GCT GTC CCC TGC GCC TTC                  42
Met Ala His Ser Glu Glu Gln Ala Ala Val Pro Cys Ala Phe
 1               5                  10

ATC CGC CAG AAC TCT GGC AAC TCA ATT TCC TTG GAC TTT GAG CCC GAC          90
Ile Arg Gln Asn Ser Gly Asn Ser Ile Ser Leu Asp Phe Glu Pro Asp
15                  20                  25                  30

ACC GAG TAC CAG TTT GTG GAG CAG CTG GAA GAA CGC TAC AAA TGT GCC         138
Thr Glu Tyr Gln Phe Val Glu Gln Leu Glu Glu Arg Tyr Lys Cys Ala
                35                  40                  45

TTC TGC CAC TCC GTG CTT CAC AAC CCC CAC CAG ACC GGC TGC GGG CAC         186
Phe Cys His Ser Val Leu His Asn Pro His Gln Thr Gly Cys Gly His
            50                  55                  60

CGC TTC TGC CAG CAG TGC ATC CGG TCT CTG AGA GAA TTG AAC TCG GTG         234
Arg Phe Cys Gln Gln Cys Ile Arg Ser Leu Arg Glu Leu Asn Ser Val
        65                  70                  75

CCG ATC TGC CCG GTA GAC AAG GAG GTC ATC AAG CCT CAG GAG GTG TTC         282
Pro Ile Cys Pro Val Asp Lys Glu Val Ile Lys Pro Gln Glu Val Phe
    80                  85                  90

AAA GAC AAC TGC TGC AAA AGA GAA GTT CTC AAT TTA CAC GTC TAC TGC         330
Lys Asp Asn Cys Cys Lys Arg Glu Val Leu Asn Leu His Val Tyr Cys
95                  100                 105                 110

AAA AAC GCC CCC GGG TGC AAT GCC AGG ATT ATT CTG GGA CGA TTC CAG         378
Lys Asn Ala Pro Gly Cys Asn Ala Arg Ile Ile Leu Gly Arg Phe Gln
                115                 120                 125

GAC CAC CTT CAG CAC TGT TCC TTC CAA GCC GTG CCC TGC CCT AAC GAG         426
Asp His Leu Gln His Cys Ser Phe Gln Ala Val Pro Cys Pro Asn Glu
```

```
          130                 135                 140
AGC TGC CGG GAA GCC ATG CTC CGG AAA GAC GTG AAA GAG CAC CTG AGC   474
Ser Cys Arg Glu Ala Met Leu Arg Lys Asp Val Lys Glu His Leu Ser
      145                 150                 155
GCA TAC TGC CGG TTC CGA GAG GAG AAG TGC CTT TAC TGC AAA AGG GAC   522
Ala Tyr Cys Arg Phe Arg Glu Glu Lys Cys Leu Tyr Cys Lys Arg Asp
    160                 165                 170
ATA GTG GTG ACC AAC CTG CAG GAT CAT GAG GAA AAC TCG TGT CCT GCG   570
Ile Val Val Thr Asn Leu Gln Asp His Glu Glu Asn Ser Cys Pro Ala
175                 180                 185                 190
TAC CCA GTG TCT TGT CCC AAC AGG TGT GTG CAG ACT ATT CCA AGA GCT   618
Tyr Pro Val Ser Cys Pro Asn Arg Cys Val Gln Thr Ile Pro Arg Ala
                195                 200                 205
AGG GTG AAT GAA CAC CTT ACT GTA TGT CCT GAG GCT GAG CAA GAC TGT   666
Arg Val Asn Glu His Leu Thr Val Cys Pro Glu Ala Glu Gln Asp Cys
          210                 215                 220
CCC TTT AAG CAC TAT GGC TGC ACT GTC AAG GGT AAG CGG GGG AAC TTG   714
Pro Phe Lys His Tyr Gly Cys Thr Val Lys Gly Lys Arg Gly Asn Leu
      225                 230                 235
CTG GAG CAT GAG CGG GCA GCC CTG CAG GAC CAC ATG CTT CTG GTT TTA   762
Leu Glu His Glu Arg Ala Ala Leu Gln Asp His Met Leu Leu Val Leu
    240                 245                 250
GAG AAG AAC TAC CAA CTA GAA CAG CGG ATC TCT GAT TTA TAT CAG AGT   810
Glu Lys Asn Tyr Gln Leu Glu Gln Arg Ile Ser Asp Leu Tyr Gln Ser
255                 260                 265                 270
CTC GAA CAG AAG GAA AGC AAG ATC CAG CAG CTG GCA GAA ACC GTG AAG   858
Leu Glu Gln Lys Glu Ser Lys Ile Gln Gln Leu Ala Glu Thr Val Lys
                275                 280                 285
AAG TTC GAA AAG GAG CTT AAG CAG TTC ACA CAG ATG TTT GGC AGA AAT   906
```

Lys Phe Glu Lys Glu Leu Lys Gln Phe Thr Gln Met Phe Gly Arg Asn
290 295 300

GGA ACT TTC CTC TCA AAT GTC CAG GCT CTC ACC AGT CAC ACG GAC AAG 954
Gly Thr Phe Leu Ser Asn Val Gln Ala Leu Thr Ser His Thr Asp Lys
305 310 315

TCA GCT TGG CTG GAA GCG CAG GTG CGG CAG CTG CTA CAA ATA GTT AAC 1002
Ser Ala Trp Leu Glu Ala Gln Val Arg Gln Leu Leu Gln Ile Val Asn
320 325 330

CAG CAG CCA AGT CGA CTT GAT CTG AGG TCT TTG GTG GAT GCG GTT GAC 1050
Gln Gln Pro Ser Arg Leu Asp Leu Arg Ser Leu Val Asp Ala Val Asp
335 340 345 350

AGC GTG AAA CAG AGG ATC ACC CAG CTG GAA GCC AGT GAC CAG AGA TTA 1098
Ser Val Lys Gln Arg Ile Thr Gln Leu Glu Ala Ser Asp Gln Arg Leu
355 360 365

GTT CTT TTA GAG GGG GAG ACC AGC AAG CAC GAC GCA CAC ATT AAT ATC 1146
Val Leu Leu Glu Gly Glu Thr Ser Lys His Asp Ala His Ile Asn Ile
370 375 380

CAC AAA GCA CAG CTG AAT AAG AAC GAA GAG CGG TTT AAG CAG CTG GAG 1194
His Lys Ala Gln Leu Asn Lys Asn Glu Glu Arg Phe Lys Gln Leu Glu
385 390 395

GGC GCC TGC TAC AGT GGC AAG CTC ATC TGG AAG GTG ACA GAT TAC AGG 1242
Gly Ala Cys Tyr Ser Gly Lys Leu Ile Trp Lys Val Thr Asp Tyr Arg
400 405 410

GTG AAG AAG AGG GAG GCC GTG GAG GGG CAC ACA GTG TCC GTC TTC AGC 1290
Val Lys Lys Arg Glu Ala Val Glu Gly His Thr Val Ser Val Phe Ser
415 420 425 430

CAG CCT TTC TAC ACC AGC CGC TGC GGC TAC CGG CTC TGT GCC AGG GCG 1338
Gln Pro Phe Tyr Thr Ser Arg Cys Gly Tyr Arg Leu Cys Ala Arg Ala
435 440 445

TAC CTG AAC GGG GAC GGG TCG GGG AAG GGA ACG CAC CTG TCC CTG TAC 1386
Tyr Leu Asn Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gly Thr His Leu Ser Leu Tyr
450 455 460

TTT GTG GTG ATG CGC GGT GAG TTT GAC TCG CTG CTG CAG TGG CCG TTC 1434
Phe Val Val Met Arg Gly Glu Phe Asp Ser Leu Leu Gln Trp Pro Phe
465 470 475

AGG CAG AGG GTG ACC CTG ATG CTT TTG GAC CAG AGC GGC AAG AAG AAC 1482
Arg Gln Arg Val Thr Leu Met Leu Leu Asp Gln Ser Gly Lys Lys Asn
480 485 490

CAT ATT GTG GAG ACC TTC AAA GCT GAC CCC AAC AGC AGC AGC TTC AAA 1530
His Ile Val Glu Thr Phe Lys Ala Asp Pro Asn Ser Ser Ser Phe Lys
495 500 505 510

AGG CCA GAT GGC GAG ATG AAC ATT GCC TCT GGC TGT CCC CGC TTT GTG 1578
Arg Pro Asp Gly Glu Met Asn Ile Ala Ser Gly Cys Pro Arg Phe Val
515 520 525

TCG CAC TCT ACT CTG GAG AAC TCC AAG AAC ACC TAC ATT AAA GAC GAC 1626
Ser His Ser Thr Leu Glu Asn Ser Lys Asn Thr Tyr Ile Lys Asp Asp
530 535 540

ACA CTG TTC TTG AAA GTG GCC GTG GAT TTA ACT GAC TTG GAG GAT CTG 1674
Thr Leu Phe Leu Lys Val Ala Val Asp Leu Thr Asp Leu Glu Asp Leu
545 550 555 558

配列番号：3

配列の長さ：２１０５

配列の型：核酸

配列の種類：ｃＤＮＡ　ｔｏ　ｍＲＮＡ

起源

　生物名：マウス

直接の起源

クローン名：pBSCRAF2（pBSTRAF5）

配列

```
TGTGAGCCGG AGGCGTGTGT GGTAGCGGGC GAACTGAGGC GACGCGGGAC ACCCGCGCCC    60
GGCCGAGGGC ACTTTTGCAA GACTTGTGAG CACAGCCCGT TAACGTGAGC TTAATGCCAG   120
GGTCTCGAGC CTGCGCCGGT GCTATAGCGC GTGCTCGATT GGAAACAGAA CCCGACTCTG   180
CAGAAGA ATG GCT CAT TCG GAG GAG CAA GCG GCT GTC CCC TGC GCC TTC      229
        Met Ala His Ser Glu Glu Gln Ala Ala Val Pro Cys Ala Phe
          1               5                  10
ATC CGC CAG AAC TCT GGC AAC TCA ATT TCC TTG GAC TTT GAG CCC GAC      277
Ile Arg Gln Asn Ser Gly Asn Ser Ile Ser Leu Asp Phe Glu Pro Asp
 15                  20                  25                  30
ACC GAG TAC CAG TTT GTG GAG CAG CTG GAA GAA CGC TAC AAA TGT GCC      325
Thr Glu Tyr Gln Phe Val Glu Gln Leu Glu Glu Arg Tyr Lys Cys Ala
                35                  40                  45
TTC TGC CAC TCC GTG CTT CAC AAC CCC CAC CAG ACC GGC TGC GGG CAC      373
Phe Cys His Ser Val Leu His Asn Pro His Gln Thr Gly Cys Gly His
            50                  55                  60
CGC TTC TGC CAG CAG TGC ATC CGG TCT CTG AGA GAA TTG AAC TCG GTG      421
Arg Phe Cys Gln Gln Cys Ile Arg Ser Leu Arg Glu Leu Asn Ser Val
        65                  70                  75
CCG ATC TGC CCG GTA GAC AAG GAG GTC ATC AAG CCT CAG GAG GTG TTC      469
Pro Ile Cys Pro Val Asp Lys Glu Val Ile Lys Pro Gln Glu Val Phe
    80                  85                  90
AAA GAC AAC TGC TGC AAA AGA GAA GTT CTC AAT TTA CAC GTC TAC TGC      517
Lys Asp Asn Cys Cys Lys Arg Glu Val Leu Asn Leu His Val Tyr Cys
 95                  100                 105                 110
AAA AAC GCC CCC GGG TGC AAT GCC AGG ATT ATT CTG GGA CGA TTC CAG      565
Lys Asn Ala Pro Gly Cys Asn Ala Arg Ile Ile Leu Gly Arg Phe Gln
                115                 120                 125
```

GAC CAC CTT CAG CAC TGT TCC TTC CAA GCC GTG CCC TGC CCT AAC GAG 613
Asp His Leu Gln His Cys Ser Phe Gln Ala Val Pro Cys Pro Asn Glu
130 135 140

AGC TGC CGG GAA GCC ATG CTC CGG AAA GAC GTG AAA GAG CAC CTG AGC 661
Ser Cys Arg Glu Ala Met Leu Arg Lys Asp Val Lys Glu His Leu Ser
145 150 155

GCA TAC TGC CGG TTC CGA GAG GAG AAG TGC CTT TAC TGC AAA AGG GAC 709
Ala Tyr Cys Arg Phe Arg Glu Glu Lys Cys Leu Tyr Cys Lys Arg Asp
160 165 170

ATA GTG GTG ACC AAC CTG CAG GAT CAT GAG GAA AAC TCG TGT CCT GCG 757
Ile Val Val Thr Asn Leu Gln Asp His Glu Glu Asn Ser Cys Pro Ala
175 180 185 190

TAC CCA GTG TCT TGT CCC AAC AGG TGT GTG CAG ACT ATT CCA AGA GCT 805
Tyr Pro Val Ser Cys Pro Asn Arg Cys Val Gln Thr Ile Pro Arg Ala
195 200 205

AGG GTG AAT GAA CAC CTT ACT GTA TGT CCT GAG GCT GAG CAA GAC TGT 853
Arg Val Asn Glu His Leu Thr Val Cys Pro Glu Ala Glu Gln Asp Cys
210 215 220

CCC TTT AAG CAC TAT GGC TGC ACT GTC AAG GGT AAG CGG GGG AAC TTG 901
Pro Phe Lys His Tyr Gly Cys Thr Val Lys Gly Lys Arg Gly Asn Leu
225 230 235

CTG GAG CAT GAG CGG GCA GCC CTG CAG GAC CAC ATG CTT CTG GTT TTA 949
Leu Glu His Glu Arg Ala Ala Leu Gln Asp His Met Leu Leu Val Leu
240 245 250

GAG AAG AAC TAC CAA CTA GAA CAG CGG ATC TCT GAT TTA TAT CAG AGT 997
Glu Lys Asn Tyr Gln Leu Glu Gln Arg Ile Ser Asp Leu Tyr Gln Ser
255 260 265 270

CTC GAA CAG AAG GAA AGC AAG ATC CAG CAG CTG GCA GAA ACC GTG AAG 1045
Leu Glu Gln Lys Glu Ser Lys Ile Gln Gln Leu Ala Glu Thr Val Lys

275 280 285

AAG TTC GAA AAG GAG CTT AAG CAG TTC ACA CAG ATG TTT GGC AGA AAT 1093
Lys Phe Glu Lys Glu Leu Lys Gln Phe Thr Gln Met Phe Gly Arg Asn

290 295 300

GGA ACT TTC CTC TCA AAT GTC CAG GCT CTC ACC AGT CAC ACG GAC AAG 1141
Gly Thr Phe Leu Ser Asn Val Gln Ala Leu Thr Ser His Thr Asp Lys

305 310 315

TCA GCT TGG CTG GAA GCG CAG GTG CGG CAG CTG CTA CAA ATA GTT AAC 1189
Ser Ala Trp Leu Glu Ala Gln Val Arg Gln Leu Leu Gln Ile Val Asn

320 325 330

CAG CAG CCA AGT CGA CTT GAT CTG AGG TCT TTG GTG GAT GCG GTT GAC 1237
Gln Gln Pro Ser Arg Leu Asp Leu Arg Ser Leu Val Asp Ala Val Asp

335 340 345 350

AGC GTG AAA CAG AGG ATC ACC CAG CTG GAA GCC AGT GAC CAG AGA TTA 1285
Ser Val Lys Gln Arg Ile Thr Gln Leu Glu Ala Ser Asp Gln Arg Leu

355 360 365

GTT CTT TTA GAG GGG GAG ACC AGC AAG CAC GAC GCA CAC ATT AAT ATC 1333
Val Leu Leu Glu Gly Glu Thr Ser Lys His Asp Ala His Ile Asn Ile

370 375 380

CAC AAA GCA CAG CTG AAT AAG AAC GAA GAG CGG TTT AAG CAG CTG GAG 1381
His Lys Ala Gln Leu Asn Lys Asn Glu Glu Arg Phe Lys Gln Leu Glu

385 390 395

GGC GCC TGC TAC AGT GGC AAG CTC ATC TGG AAG GTG ACA GAT TAC AGG 1429
Gly Ala Cys Tyr Ser Gly Lys Leu Ile Trp Lys Val Thr Asp Tyr Arg

400 405 410

GTG AAG AAG AGG GAG GCC GTG GAG GGG CAC ACA GTG TCC GTC TTC AGC 1477
Val Lys Lys Arg Glu Ala Val Glu Gly His Thr Val Ser Val Phe Ser

415 420 425 430

CAG CCT TTC TAC ACC AGC CGC TGC GGC TAC CGG CTC TGT GCC AGG GCG 1525

Gln Pro Phe Tyr Thr Ser Arg Cys Gly Tyr Arg Leu Cys Ala Arg Ala
435 440 445

TAC CTG AAC GGG GAC GGG TCG GGG AAG GGA ACG CAC CTG TCC CTG TAC 1573
Tyr Leu Asn Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gly Thr His Leu Ser Leu Tyr
450 455 460

TTT GTG GTG ATG CGC GGT GAG TTT GAC TCG CTG CTG CAG TGG CCG TTC 1621
Phe Val Val Met Arg Gly Glu Phe Asp Ser Leu Leu Gln Trp Pro Phe
465 470 475

AGG CAG AGG GTG ACC CTG ATG CTT TTG GAC CAG AGC GGC AAG AAG AAC 1669
Arg Gln Arg Val Thr Leu Met Leu Leu Asp Gln Ser Gly Lys Lys Asn
480 485 490

CAT ATT GTG GAG ACC TTC AAA GCT GAC CCC AAC AGC AGC AGC TTC AAA 1717
His Ile Val Glu Thr Phe Lys Ala Asp Pro Asn Ser Ser Ser Phe Lys
495 500 505 510

AGG CCA GAT GGC GAG ATG AAC ATT GCC TCT GGC TGT CCC CGC TTT GTG 1765
Arg Pro Asp Gly Glu Met Asn Ile Ala Ser Gly Cys Pro Arg Phe Val
515 520 525

TCG CAC TCT ACT CTG GAG AAC TCC AAG AAC ACC TAC ATT AAA GAC GAC 1813
Ser His Ser Thr Leu Glu Asn Ser Lys Asn Thr Tyr Ile Lys Asp Asp
530 535 540

ACA CTG TTC TTG AAA GTG GCC GTG GAT TTA ACT GAC TTG GAG GAT CTG 1861
Thr Leu Phe Leu Lys Val Ala Val Asp Leu Thr Asp Leu Glu Asp Leu
545 550 555 558

TAG TGTTACCTGA TAAGGAAACT TCTCAGCACA GGAAAAGGTG TGGCTGTCCC 1914

TTGGGCGCAG CCCTCTGGAC TGAGCAGGCT CTTGTTCTTG TCTTCCTGCC TCCGATGTCT 1974

GATGTGTCAT CTTTTTATCT TGGATCCTTC CCTGGTTTGA AACTTTAAAC TCTTGAAATA 2034

TTGCTGTTAT TTATATTTTT GTATCTTCCA AAAAATTATA ATAATTTGAC AACAAAAAAA 2094

AAAAAAAAAA A 2105

配列番号：4

配列の長さ：557

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Tyr Ser Glu Glu His Lys Gly Met Pro Cys Gly Phe Ile
1 5 10 15

Arg Gln Asn Ser Gly Asn Ser Ile Ser Leu Asp Phe Glu Pro Ser
20 25 30

Ile Glu Tyr Gln Phe Val Glu Arg Leu Glu Glu Arg Tyr Lys Cys
35 40 45

Ala Phe Cys His Ser Val Leu His Asn Pro His Gln Thr Gly Cys
50 55 60

Gly His Arg Phe Cys Gln His Cys Ile Leu Ser Leu Arg Glu Leu
65 70 75

Asn Thr Val Pro Ile Cys Pro Val Asp Lys Glu Val Ile Lys Ser
80 85 90

Gln Glu Val Phe Lys Asp Asn Cys Cys Lys Arg Glu Val Leu Asn
95 100 105

Leu Tyr Val Tyr Cys Ser Asn Ala Pro Gly Cys Asn Ala Lys Val
110 115 120

Ile Leu Gly Arg Tyr Gln Asp His Leu Gln Gln Cys Leu Phe Gln
125 130 135

Pro Val Gln Cys Ser Asn Glu Lys Cys Arg Glu Pro Val Leu Arg
140 145 150

Lys Asp Leu Lys Glu His Leu Ser Ala Ser Cys Gln Phe Arg Lys
155 160 165

Glu Lys Cys Leu Tyr Cys Lys Lys Asp Val Val Val Ile Asn Leu
170 175 180

Gln Asn His Glu Glu Asn Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Val Phe Cys
185 190 195

Pro Asn Asn Cys Ala Lys Ile Ile Leu Lys Thr Glu Val Asp Glu
200 205 210

His Leu Ala Val Cys Pro Glu Ala Glu Gln Asp Cys Pro Phe Lys
215 220 225

His Tyr Gly Cys Ala Val Thr Asp Lys Arg Arg Asn Leu Gln Gln
230 235 240

His Glu His Ser Ala Leu Arg Glu His Met Arg Leu Val Leu Glu
245 250 255

Lys Asn Val Gln Leu Glu Glu Gln Ile Ser Asp Leu His Lys Ser
260 265 270

Leu Glu Gln Lys Glu Ser Lys Ile Gln Gln Leu Ala Glu Thr Ile
275 280 285

Lys Lys Leu Glu Lys Glu Phe Lys Gln Phe Ala Gln Leu Phe Gly
290 295 300

Lys Asn Gly Ser Phe Leu Pro Asn Ile Gln Val Phe Ala Ser His
305 310 315

Ile Asp Lys Ser Ala Trp Leu Glu Ala Gln Val His Gln Leu Leu
320 325 330

Gln Met Val Asn Gln Gln Gln Asn Lys Phe Asp Leu Arg Pro Leu
335 340 345

Met Glu Ala Val Asp Thr Val Lys Gln Lys Ile Thr Leu Leu Glu
350 355 360

Asn Asn Asp Gln Arg Leu Ala Val Leu Glu Glu Glu Thr Asn Lys
365 370 375

His Asp Thr His Ile Asn Ile His Lys Ala Gln Leu Ser Lys Asn
380 385 390

Glu Glu Arg Phe Lys Leu Leu Glu Gly Thr Cys Tyr Asn Gly Lys

395 400 405

Leu Ile Trp Lys Val Thr Asp Tyr Lys Met Lys Lys Arg Glu Ala

410 415 420

Val Asp Gly His Thr Val Ser Ile Phe Ser Gln Ser Phe Tyr Thr

425 430 435

Ser Arg Cys Gly Tyr Arg Leu Cys Ala Arg Ala Tyr Leu Asn Gly

440 445 450

Asp Gly Ser Gly Arg Gly Ser His Leu Ser Leu Tyr Phe Val Val

455 460 465

Met Arg Gly Glu Phe Asp Ser Leu Leu Gln Trp Pro Phe Arg Gln

470 475 480

Arg Val Thr Leu Met Leu Leu Asp Gln Ser Gly Lys Lys Asn Ile

485 490 495

Met Glu Thr Phe Lys Pro Asp Pro Asn Ser Ser Ser Phe Lys Arg

500 505 510

Pro Asp Gly Glu Met Asn Ile Ala Ser Gly Cys Pro Arg Phe Val

515 520 525

Ala His Ser Val Leu Glu Asn Ala Lys Asn Ala Tyr Ile Lys Asp

530 535 540

Asp Thr Leu Phe Leu Lys Val Ala Val Asp Leu Thr Asp Leu Glu

545 550 555

Asp Leu

557

配列番号：5

配列の長さ：１６７１

配列の型：核酸

配列の種類：ｃＤＮＡ　ｔｏ　ｍＲＮＡ

起源

生物名：ヒト

配列

ATG GCT TAT TCA GAA GAG CAT AAA GGT ATG CCC TGT GGT TTC ATC 45
Met Ala Tyr Ser Glu Glu His Lys Gly Met Pro Cys Gly Phe Ile
1 5 10 15

CGC CAG AAT TCC GGC AAC TCC ATT TCC TTG GAC TTT GAG CCC AGT 90
Arg Gln Asn Ser Gly Asn Ser Ile Ser Leu Asp Phe Glu Pro Ser
20 25 30

ATA GAG TAC CAG TTT GTG GAG CGG TTG GAA GAG CGC TAC AAA TGT 135
Ile Glu Tyr Gln Phe Val Glu Arg Leu Glu Glu Arg Tyr Lys Cys
35 40 45

GCC TTC TGC CAC TCG GTG CTT CAC AAC CCC CAC CAG ACA GGA TGT 180
Ala Phe Cys His Ser Val Leu His Asn Pro His Gln Thr Gly Cys
50 55 60

GGG CAC CGC TTC TGC CAG CAC TGC ATC CTG TCC CTG AGA GAA TTA 225
Gly His Arg Phe Cys Gln His Cys Ile Leu Ser Leu Arg Glu Leu
65 70 75

AAC ACA GTG CCA ATC TGC CCT GTA GAT AAA GAG GTC ATC AAA TCT 270
Asn Thr Val Pro Ile Cys Pro Val Asp Lys Glu Val Ile Lys Ser
80 85 90

CAG GAG GTT TTT AAA GAC AAT TGT TGC AAA AGA GAA GTC CTC AAC 315
Gln Glu Val Phe Lys Asp Asn Cys Cys Lys Arg Glu Val Leu Asn
95 100 105

TTA TAT GTA TAT TGC AGC AAT GCT CCT GGA TGT AAT GCC AAG GTT 360
Leu Tyr Val Tyr Cys Ser Asn Ala Pro Gly Cys Asn Ala Lys Val
110 115 120

ATT CTG GGC CGG TAC CAG GAT CAC CTT CAG CAG TGC TTA TTT CAA 405
Ile Leu Gly Arg Tyr Gln Asp His Leu Gln Gln Cys Leu Phe Gln
125 130 135

CCT GTG CAG TGT TCT AAT GAG AAG TGC CGG GAG CCA GTC CTA CGG 450
Pro Val Gln Cys Ser Asn Glu Lys Cys Arg Glu Pro Val Leu Arg
140 145 150
AAA GAC CTG AAA GAG CAT TTG AGT GCA TCC TGT CAG TTT CGA AAG 495
Lys Asp Leu Lys Glu His Leu Ser Ala Ser Cys Gln Phe Arg Lys
155 160 165
GAA AAA TGC CTT TAT TGC AAA AAG GAT GTG GTA GTC ATC AAT CTA 540
Glu Lys Cys Leu Tyr Cys Lys Lys Asp Val Val Val Ile Asn Leu
170 175 180
CAG AAT CAT GAG GAA AAC TTG TGT CCT GAA TAC CCA GTA TTT TGT 585
Gln Asn His Glu Glu Asn Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Val Phe Cys
185 190 195
CCC AAC AAT TGT GCG AAG ATT ATT CTA AAA ACT GAG GTA GAT GAA 630
Pro Asn Asn Cys Ala Lys Ile Ile Leu Lys Thr Glu Val Asp Glu
200 205 210
CAC CTG GCT GTA TGT CCT GAA GCT GAG CAA GAC TGT CCT TTT AAG 675
His Leu Ala Val Cys Pro Glu Ala Glu Gln Asp Cys Pro Phe Lys
215 220 225
CAC TAT GGC TGT GCT GTA ACG GAT AAA CGG AGG AAC CTG CAG CAA 720
His Tyr Gly Cys Ala Val Thr Asp Lys Arg Arg Asn Leu Gln Gln
230 235 240
CAT GAG CAT TCA GCC TTA CGG GAG CAC ATG CGT TTG GTT TTA GAA 765
His Glu His Ser Ala Leu Arg Glu His Met Arg Leu Val Leu Glu
245 250 255
AAG AAT GTC CAA TTA GAA GAA CAG ATT TCT GAC TTA CAC AAG AGC 810
Lys Asn Val Gln Leu Glu Glu Gln Ile Ser Asp Leu His Lys Ser
260 265 270
CTA GAA CAG AAA GAA AGT AAA ATC CAG CAG CTA GCA GAA ACT ATA 855
Leu Glu Gln Lys Glu Ser Lys Ile Gln Gln Leu Ala Glu Thr Ile

275 280 285

AAG AAA CTT GAA AAG GAG TTC AAG CAG TTT GCA CAG TTG TTT GGC 900
Lys Lys Leu Glu Lys Glu Phe Lys Gln Phe Ala Gln Leu Phe Gly

290 295 300

AAA AAT GGA AGC TTC CTC CCA AAC ATC CAG GTT TTT GCC AGT CAC 945
Lys Asn Gly Ser Phe Leu Pro Asn Ile Gln Val Phe Ala Ser His

305 310 315

ATT GAC AAG TCA GCT TGG CTA GAA GCT CAA GTG CAT CAA TTA TTA 990
Ile Asp Lys Ser Ala Trp Leu Glu Ala Gln Val His Gln Leu Leu

320 325 330

CAA ATG GTT AAC CAG CAA CAA AAT AAA TTT GAC CTG AGA CCT TTG 1035
Gln Met Val Asn Gln Gln Gln Asn Lys Phe Asp Leu Arg Pro Leu

335 340 345

ATG GAA GCA GTT GAT ACA GTG AAA CAG AAA ATT ACC CTG CTA GAA 1080
Met Glu Ala Val Asp Thr Val Lys Gln Lys Ile Thr Leu Leu Glu

350 355 360

AAC AAT GAT CAA AGA TTA GCC GTT TTA GAA GAG GAA ACT AAC AAA 1125
Asn Asn Asp Gln Arg Leu Ala Val Leu Glu Glu Glu Thr Asn Lys

365 370 375

CAT GAT ACC CAC ATT AAT ATT CAT AAA GCA CAG CTG AGT AAA AAT 1170
His Asp Thr His Ile Asn Ile His Lys Ala Gln Leu Ser Lys Asn

380 385 390

GAA GAG CGA TTT AAA CTG CTG GAG GGT ACT TGC TAT AAT GGA AAG 1215
Glu Glu Arg Phe Lys Leu Leu Glu Gly Thr Cys Tyr Asn Gly Lys

395 400 405

CTC ATT TGG AAG GTG ACA GAT TAC AAG ATG AAG AAG AGA GAG GCG 1260
Leu Ile Trp Lys Val Thr Asp Tyr Lys Met Lys Lys Arg Glu Ala

410 415 420

GTG GAT GGG CAC ACA GTG TCC ATC TTC AGC CAG TCC TTC TAC ACC 1305

Val Asp Gly His Thr Val Ser Ile Phe Ser Gln Ser Phe Tyr Thr
425 430 435

AGC CGC TGT GGC TAC CGG CTC TGT GCT AGA GCA TAC CTG AAT GGG 1350
Ser Arg Cys Gly Tyr Arg Leu Cys Ala Arg Ala Tyr Leu Asn Gly
440 445 450

GAT GGG TCA GGG AGG GGG TCA CAC CTG TCC CTA TAC TTT GTG GTC 1395
Asp Gly Ser Gly Arg Gly Ser His Leu Ser Leu Tyr Phe Val Val
455 460 465

ATG CGA GGA GAG TTT GAC TCA CTG TTG CAG TGG CCA TTC AGG CAG 1440
Met Arg Gly Glu Phe Asp Ser Leu Leu Gln Trp Pro Phe Arg Gln
470 475 480

AGG GTG ACC CTG ATG CTT CTG GAC CAG AGT GGC AAA AAG AAC ATT 1485
Arg Val Thr Leu Met Leu Leu Asp Gln Ser Gly Lys Lys Asn Ile
485 490 495

ATG GAG ACC TTC AAA CCT GAC CCC AAT AGC AGC AGC TTT AAA AGA 1530
Met Glu Thr Phe Lys Pro Asp Pro Asn Ser Ser Ser Phe Lys Arg
500 505 510

CCT GAT GGG GAG ATG AAC ATT GCA TCT GGC TGT CCC CGC TTT GTG 1575
Pro Asp Gly Glu Met Asn Ile Ala Ser Gly Cys Pro Arg Phe Val
515 520 525

GCT CAT TCT GTT TTG GAG AAT GCC AAG AAC GCC TAC ATT AAA GAT 1620
Ala His Ser Val Leu Glu Asn Ala Lys Asn Ala Tyr Ile Lys Asp
530 535 540

GAC ACT CTG TTC TTG AAA GTG GCC GTG GAC TTA ACT GAC CTG GAG 1665
Asp Thr Leu Phe Leu Lys Val Ala Val Asp Leu Thr Asp Leu Glu
545 550 555

GAT CTC 1671
Asp Leu
557

配列番号：6

配列の長さ：３９９３

配列の型：核酸

配列の種類：ｃＤＮＡ　ｔｏ　ｍＲＮＡ

起源

　生物名：ヒト

直接の起源

　クローン名：ｐＢＳｈＴＲＡＦ５

配列

GCAGCAGCCG CGCCTGCAGA CCGGCCTCGC GGAGCCCGCG CGCCGAGCCC CACA 54

ATG GCT TAT TCA GAA GAG CAT AAA GGT ATG CCC TGT GGT TTC ATC 99
Met Ala Tyr Ser Glu Glu His Lys Gly Met Pro Cys Gly Phe Ile
1 5 10 15

CGC CAG AAT TCC GGC AAC TCC ATT TCC TTG GAC TTT GAG CCC AGT 144
Arg Gln Asn Ser Gly Asn Ser Ile Ser Leu Asp Phe Glu Pro Ser
20 25 30

ATA GAG TAC CAG TTT GTG GAG CGG TTG GAA GAG CGC TAC AAA TGT 189
Ile Glu Tyr Gln Phe Val Glu Arg Leu Glu Glu Arg Tyr Lys Cys
35 40 45

GCC TTC TGC CAC TCG GTG CTT CAC AAC CCC CAC CAG ACA GGA TGT 234
Ala Phe Cys His Ser Val Leu His Asn Pro His Gln Thr Gly Cys
50 55 60

GGG CAC CGC TTC TGC CAG CAC TGC ATC CTG TCC CTG AGA GAA TTA 279
Gly His Arg Phe Cys Gln His Cys Ile Leu Ser Leu Arg Glu Leu
65 70 75

AAC ACA GTG CCA ATC TGC CCT GTA GAT AAA GAG GTC ATC AAA TCT 324
Asn Thr Val Pro Ile Cys Pro Val Asp Lys Glu Val Ile Lys Ser
80 85 90

CAG GAG GTT TTT AAA GAC AAT TGT TGC AAA AGA GAA GTC CTC AAC 369
Gln Glu Val Phe Lys Asp Asn Cys Cys Lys Arg Glu Val Leu Asn
95 100 105
TTA TAT GTA TAT TGC AGC AAT GCT CCT GGA TGT AAT GCC AAG GTT 414
Leu Tyr Val Tyr Cys Ser Asn Ala Pro Gly Cys Asn Ala Lys Val
110 115 120
ATT CTG GGC CGG TAC CAG GAT CAC CTT CAG CAG TGC TTA TTT CAA 459
Ile Leu Gly Arg Tyr Gln Asp His Leu Gln Gln Cys Leu Phe Gln
125 130 135
CCT GTG CAG TGT TCT AAT GAG AAG TGC CGG GAG CCA GTC CTA CGG 504
Pro Val Gln Cys Ser Asn Glu Lys Cys Arg Glu Pro Val Leu Arg
140 145 150
AAA GAC CTG AAA GAG CAT TTG AGT GCA TCC TGT CAG TTT CGA AAG 549
Lys Asp Leu Lys Glu His Leu Ser Ala Ser Cys Gln Phe Arg Lys
155 160 165
GAA AAA TGC CTT TAT TGC AAA AAG GAT GTG GTA GTC ATC AAT CTA 594
Glu Lys Cys Leu Tyr Cys Lys Lys Asp Val Val Val Ile Asn Leu
170 175 180
CAG AAT CAT GAG GAA AAC TTG TGT CCT GAA TAC CCA GTA TTT TGT 639
Gln Asn His Glu Glu Asn Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Val Phe Cys
185 190 195
CCC AAC AAT TGT GCG AAG ATT ATT CTA AAA ACT GAG GTA GAT GAA 684
Pro Asn Asn Cys Ala Lys Ile Ile Leu Lys Thr Glu Val Asp Glu
200 205 210
CAC CTG GCT GTA TGT CCT GAA GCT GAG CAA GAC TGT CCT TTT AAG 725
His Leu Ala Val Cys Pro Glu Ala Glu Gln Asp Cys Pro Phe Lys
215 220 225
CAC TAT GGC TGT GCT GTA ACG GAT AAA CGG AGG AAC CTG CAG CAA 774
His Tyr Gly Cys Ala Val Thr Asp Lys Arg Arg Asn Leu Gln Gln

230 235 240

CAT GAG CAT TCA GCC TTA CGG GAG CAC ATG CGT TTG GTT TTA GAA 819
His Glu His Ser Ala Leu Arg Glu His Met Arg Leu Val Leu Glu
245 250 255

AAG AAT GTC CAA TTA GAA GAA CAG ATT TCT GAC TTA CAC AAG AGC 864
Lys Asn Val Gln Leu Glu Glu Gln Ile Ser Asp Leu His Lys Ser
260 265 270

CTA GAA CAG AAA GAA AGT AAA ATC CAG CAG CTA GCA GAA ACT ATA 909
Leu Glu Gln Lys Glu Ser Lys Ile Gln Gln Leu Ala Glu Thr Ile
275 280 285

AAG AAA CTT GAA AAG GAG TTC AAG CAG TTT GCA CAG TTG TTT GGC 954
Lys Lys Leu Glu Lys Glu Phe Lys Gln Phe Ala Gln Leu Phe Gly
290 295 300

AAA AAT GGA AGC TTC CTC CCA AAC ATC CAG GTT TTT GCC AGT CAC 999
Lys Asn Gly Ser Phe Leu Pro Asn Ile Gln Val Phe Ala Ser His
305 310 315

ATT GAC AAG TCA GCT TGG CTA GAA GCT CAA GTG CAT CAA TTA TTA 1044
Ile Asp Lys Ser Ala Trp Leu Glu Ala Gln Val His Gln Leu Leu
320 325 330

CAA ATG GTT AAC CAG CAA CAA AAT AAA TTT GAC CTG AGA CCT TTG 1089
Gln Met Val Asn Gln Gln Gln Asn Lys Phe Asp Leu Arg Pro Leu
335 340 345

ATG GAA GCA GTT GAT ACA GTG AAA CAG AAA ATT ACC CTG CTA GAA 1134
Met Glu Ala Val Asp Thr Val Lys Gln Lys Ile Thr Leu Leu Glu
350 355 360

AAC AAT GAT CAA AGA TTA GCC GTT TTA GAA GAG GAA ACT AAC AAA 1179
Asn Asn Asp Gln Arg Leu Ala Val Leu Glu Glu Glu Thr Asn Lys
365 370 375

CAT GAT ACC CAC ATT AAT ATT CAT AAA GCA CAG CTG AGT AAA AAT 1224

His Asp Thr His Ile Asn Ile His Lys Ala Gln Leu Ser Lys Asn
380 385 390

GAA GAG CGA TTT AAA CTG CTG GAG GGT ACT TGC TAT AAT GGA AAG 1269
Glu Glu Arg Phe Lys Leu Leu Glu Gly Thr Cys Tyr Asn Gly Lys
395 400 405

CTC ATT TGG AAG GTG ACA GAT TAC AAG ATG AAG AAG AGA GAG GCG 1314
Leu Ile Trp Lys Val Thr Asp Tyr Lys Met Lys Lys Arg Glu Ala
410 415 420

GTG GAT GGG CAC ACA GTG TCC ATC TTC AGC CAG TCC TTC TAC ACC 1359
Val Asp Gly His Thr Val Ser Ile Phe Ser Gln Ser Phe Tyr Thr
425 430 435

AGC CGC TGT GGC TAC CGG CTC TGT GCT AGA GCA TAC CTG AAT GGG 1404
Ser Arg Cys Gly Tyr Arg Leu Cys Ala Arg Ala Tyr Leu Asn Gly
440 445 450

GAT GGG TCA GGG AGG GGG TCA CAC CTG TCC CTA TAC TTT GTG GTC 1449
Asp Gly Ser Gly Arg Gly Ser His Leu Ser Leu Tyr Phe Val Val
455 460 465

ATG CGA GGA GAG TTT GAC TCA CTG TTG CAG TGG CCA TTC AGG CAG 1494
Met Arg Gly Glu Phe Asp Ser Leu Leu Gln Trp Pro Phe Arg Gln
470 475 480

AGG GTG ACC CTG ATG CTT CTG GAC CAG AGT GGC AAA AAG AAC ATT 1539
Arg Val Thr Leu Met Leu Leu Asp Gln Ser Gly Lys Lys Asn Ile
485 490 495

ATG GAG ACC TTC AAA CCT GAC CCC AAT AGC AGC AGC TTT AAA AGA 1584
Met Glu Thr Phe Lys Pro Asp Pro Asn Ser Ser Ser Phe Lys Arg
500 505 510

CCT GAT GGG GAG ATG AAC ATT GCA TCT GGC TGT CCC CGC TTT GTG 1629
Pro Asp Gly Glu Met Asn Ile Ala Ser Gly Cys Pro Arg Phe Val
515 520 525

GCT CAT TCT GTT TTG GAG AAT GCC AAG AAC GCC TAC ATT AAA GAT 1674
Ala His Ser Val Leu Glu Asn Ala Lys Asn Ala Tyr Ile Lys Asp
530 535 540
GAC ACT CTG TTC TTG AAA GTG GCC GTG GAC TTA ACT GAC CTG GAG 1719
Asp Thr Leu Phe Leu Lys Val Ala Val Asp Leu Thr Asp Leu Glu
545 550 555
GAT CTC TAGTC ACTGTTATGG GGTGATAAGA GGACTTCTTG GGGCCAGAAC 1770
Asp Leu
557
TGTGGAGGAG AGCACATTTG ATTATCATAT TGACCTGGAT TTAGACTCAA 1820
AGCACATTTG TATTTGCCTT TTTCCTTAAC GTTTGAAGTC AGTTTAAAAC 1870
TTCTGAAGTG CTGTCTTTTT ACATTTTACT CTGTCCCAGT TTGAAACTTA 1920
AAACTCTTAG AATATTCTCT TATTATTTAT ATTTTTATAT TTCTTGAAAG 1970
ATGGTAAGTT TCTTGAAGTT TTTGGGGCGT TTCTCTTTTA CTGGTGCTTA 2020
GCGCAGTGTC TCGGGCACTC TAAATATTGA GTGTTATGGA GGACACAGAG 2070
GTAGCAGAAT CCCAGTTGAA AATGTTTTGA TATTTTATTG TTTGGCCTAT 2120
TGATTCTAGA CCTGGCCTTA AGTCTGCAAA AGCCATCTTT ATAAGGTAGG 2170
CTGTTCCAGT TAAGAAGTGG GTGATGTAGT TACAAAGATA ATATGCTCAG 2220
TTTGGACCTT TTTTTCAGTT AAATGCTAAA TATATGAAAA TTACTATACC 2270
TCTAAGTATT TTCATGAAAT TCACCAGCAG TTTGCAAGCA CAGTTTTGCA 2320
AGGCTGCATA AGAACTGGTG AATGGGGTAA GCATTTTCAT TCTTCCTGCT 2370
GAAGTAAAGC AGAAAGTACT GCATAGTATA TGAGATATAG CCAGCTAGCT 2420
AAAGTTCAGA TTTTGTTAGG TTCAACCCTA TGAAAAAAAC TATTTTCATA 2470
GGTCAAAAAT GGTAAAAAAT TAGCAGTTTC ATAAGATTCA ACCAAATAAA 2520
TATATATATA CACACACACA TACATATACA CCTATATATG TGTGTATACA 2570
AACAGTTCGA ATGTATTTTG GTGACAGTAA TAAATCAATG TGAGGATGGA 2620
TAGAATTTAG TATATGATAG AGAAAATGTC ATAAATGGAT AAAAGGAATT 2670
TACAACTTGA GGAGAAAACC TTTACAATTT CCTATGGGTG TCAGAAGTAC 2720
TCTCAGCGAA AACTGATGGC TAAAACAGTA TCTACTATTC TCTGATAACT 2770

TTTTTTTTGA GACAGAGTTT CATTGTCACC CAGGCTGGAG TACAGTGGCA 2820
TGATCTCAGC TCACTGCAAA CTCTGCCTCC CGAATTCAAG TGATTCTCCT 2870
GCCTCAGCCT CCTGAGTAGC TGGGATTACA GGCGCCCGTC ACCACACCCA 2920
GGTAATTTTT GTATTTTTAG TAGAGACGGA GTTTTGCCAT GTTGGCCAAG 2970
CTGATCTCAA ACTCCTGACC TCAAGTGATC TGCCCGCCTC GGCCTCCCAA 3020
AGTGCTGAGA TTACAGGCAT GACCCACCGC GTCAAGCCTC TGACAACTAT 3070
TGAATTTGTA AGCTGCTATG CAAATGGGCA TTTATATAAA CTTGTGATGT 3120
TTCTTGTCAG AATTCTGAGT ACTCTGTGAA GAACAGAAAT GATCATATTC 3170
TTATGCATCT ATCTGTATGG GTCTGAAGGT GTATATACAA ACTGAGATGA 3220
GTCCTTATGA CTCTTGATAA GCCTGAGTTT AACAACAACA AAAATGCCAA 3270
GTTGTCCTGA GCCCTTCTGC GTTGTTATGC CACTTCCCTA CTGCTCATAT 3320
GCACGCTGGC TCCCCTGGGC ACGCAAGGAT GAGTATGGGC CATGGGCCCC 3370
TGTAGAGCTG CTTACCTGGT GATGACCATG CACCTTACAA TTTCTGAACA 3420
GTTAACCCTA TAGAAGCATG CTTTATATGA GTGTCTTCTG GGAAGAGGAA 3470
CCTTCTTAAT CTCTTCTGTG GGATTTTCAA AATGCTAAAG ACTCACACTG 3520
CAGCAATCAT CCCAGATGAT TAAATTCAAA GAAATAGGTT CACAACAGGA 3570
ATATACTGAA GAACTAGAGT GTCACTGCTG GTGAACTGTG GCACGGTTGC 3620
TCAACACATC ACCTCGGACA AATTCAGGAA GCATTTCTTT AGCCCACAAG 3670
TCCAGACCCA GGTGCTCTGT ATGTTTGTTT TTAATATTCA TCATATCCAA 3720
GTTCACTCTG TCTTCCTGAG CAGTGGAAGA TCATATTGCT GTAACTTCTT 3770
TTAAGTAGTT GATGTGGAAA ACATTTTAAA GTGAATTTGT CAAAATGCTG 3820
GTTTTGTGTT TTATCCAACT TTTGTGCATA TATATAAAGT ATGTCATGGC 3870
ATGGTTTGCT TAGGAGTTCA GAGTTCCTTC ATCATCGAAA TAGTGATTAA 3920
GTGATCCCAG AACAAGGAAT ACTAGAGTAA AAAGCACCTC TTTTTCAGAA 3970
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 3993

請求の範囲

1．　ＣＤ４０の細胞内ドメインに結合するＴＲＡＦ５蛋白質。

2．　配列表の配列番号１の４５番目～８４番目、１１０番目～２４９番目、２５１番目～４０３番目、４０４番目～５５８番目のアミノ酸配列で示されるポリペプチドの少なくとも１つを含むポリペプチド。

3．　配列表の配列番号４の４５番目～８４番目、１１０番目～２４９番目、２５１番目～４０３番目、４０４番目～５５７番目のアミノ酸配列で示されるポリペプチドの少なくとも１つを含むポリペプチド。

4．　配列表の配列番号１記載のポリペプチドを含むポリペプチド。

5．　配列表の配列番号４記載のポリペプチドを含むポリペプチド。

6．　配列表の配列番号１記載のポリペプチドまたはその一部からなるポリペプチド。

7．　配列表の配列番号４記載のポリペプチドまたはその一部からなるポリペプチド。

8．　配列表の配列番号１の４５番目～８４番目、１１０番目～２４９番目、２５１番目～４０３番目、４０４番目～５５８番目のアミノ酸配列で示されるポリペプチドの少なくとも１つのポリペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡ。

9．　配列表の配列番号４の４５番目～８４番目、１１０番目～２４９番目、２５１番目～４０３番目、４０４番目～５５７番目のアミノ酸配列で示されるポリペプチドの少なくとも１つのポリペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡ。

１０．　請求項６記載のポリペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮＡ。

１１．　請求項７記載のポリペプチドをコードする塩基配列を含むＤＮ

Ａ。

１２．　配列表の配列番号２の塩基配列またはその一部を含むＤＮＡ。

１３．　配列表の配列番号５の塩基配列またはその一部を含むＤＮＡ。

１４．　請求項８、１０または１２に記載のＤＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその誘導体。

１５．　請求項９、１１または１３に記載のＤＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその誘導体。

１６．　請求項１に記載のＴＲＡＦ５蛋白質を認識する抗体。

１７．　請求項２、４又は６に記載のポリペプチドを認識する抗体。

１８．　請求項３、５又は７に記載のポリペプチドを認識する抗体。

１９．　ＣＤ４０のシグナル伝達を阻害する抗体である請求項１６、１７または１８に記載の抗体。

２０．　モノクローナル抗体である請求項１６、１７、１８または１９に記載の抗体。

２１．　請求項８、１０または１２に記載のＤＮＡを含有するベクター。

２２．　請求項９、１１または１３に記載のＤＮＡを含有するベクター。

２３．　請求項２１に記載のベクターによる形質転換体。

２４．　請求項２２に記載のベクターによる形質転換体。

２５．　請求項２３に記載の形質転換体を培養することからなるＴＲＡＦ５またはポリペプチドの製造方法。

２６．　請求項２４に記載の形質転換体を培養することからなるＴＲＡＦ５またはポリペプチドの製造方法。

２７．　請求項１に記載のＴＲＡＦ５蛋白質、請求項２ないし７のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項１６ないし１８のいずれか一項に記載の抗体を使用することを特徴とする、それらに結合する物質、それらの活性を調節する物質、又はそれらの発現を調節する物質のスクリーニング方法。

２８．　請求項２７に記載のスクリーニング方法によって得られる．請求項１に記載のＴＲＡＦ５蛋白質または請求項２ないし７のいずれか一項に記載のポリペプチドに結合する物質、それらの活性を調節する物質、又はそれらの発現を調節する物質。

２９．　請求項１に記載のＴＲＡＦ５蛋白質または請求項２ないし７のいずれか一項に記載のポリペプチドを有効成分として含有する免疫疾患治療薬。

３０．　請求項１に記載のＴＲＡＦ５蛋白質または請求項２ないし７のいずれか一項に記載のポリペプチドを有効成分として含有するアレルギー治療薬。

３１．　請求項１に記載のＴＲＡＦ５蛋白質または請求項２ないし７のいずれか一項に記載のポリペプチドを有効成分として含有する抗細胞増殖治療薬。

３２．　請求項１４又は１５に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその誘導体を有効成分として含有する免疫疾患治療薬。

３３．　請求項１４又は１５に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその誘導体を有効成分として含有するアレルギー治療薬。

３４．　請求項１４又は１５に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその誘導体を有効成分として含有する抗細胞増殖治療薬。

３５．　請求項１６ないし２０のいずれか一項に記載の抗体を有効成分として含有する免疫疾患治療薬。

３６．　請求項１６ないし２０のいずれか一項に記載の抗体を有効成分として含有するアレルギー治療薬。

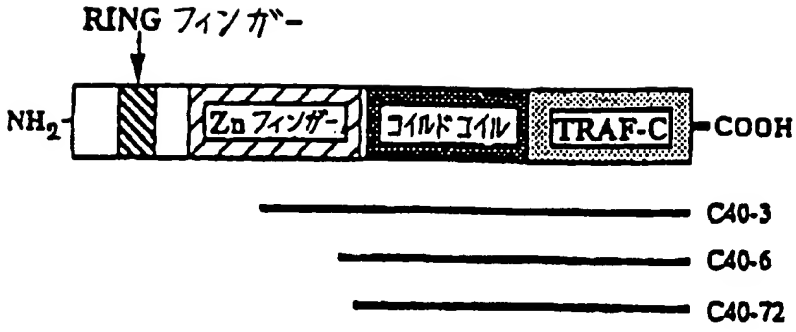
３７．　請求項１６ないし２０のいずれか一項に記載の抗体を有効成分として含有する抗細胞増殖治療薬。

３８．　請求項２８に記載の物質を有効成分として含有する免疫疾患治療薬。

３９．　請求項２８に記載の物質を有効成分として含有するアレルギー治療薬。

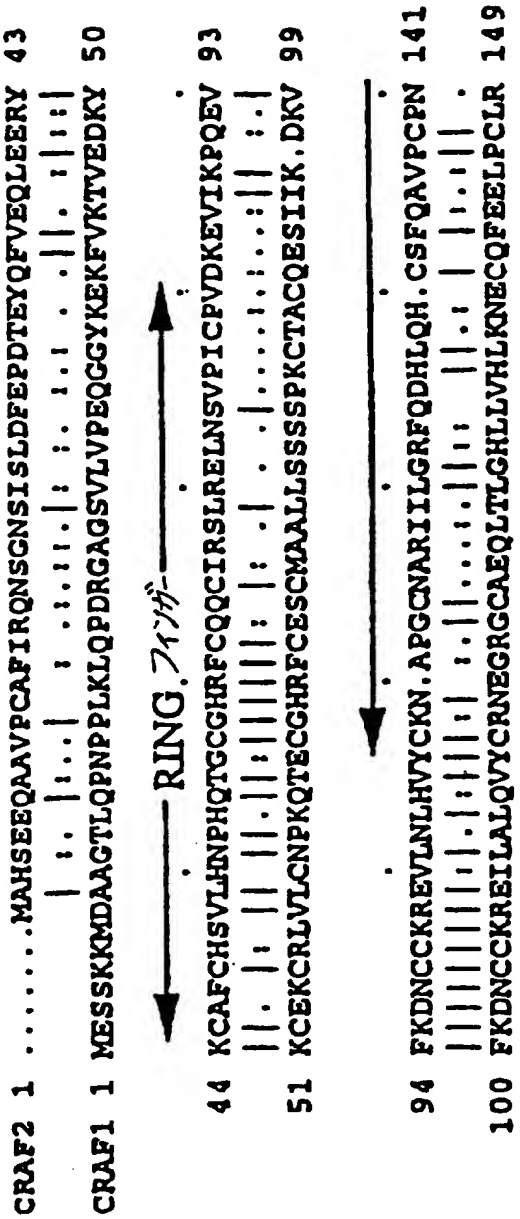
４０．　請求項２８に記載の物質を有効成分として含有する抗細胞増殖治療薬。

図1



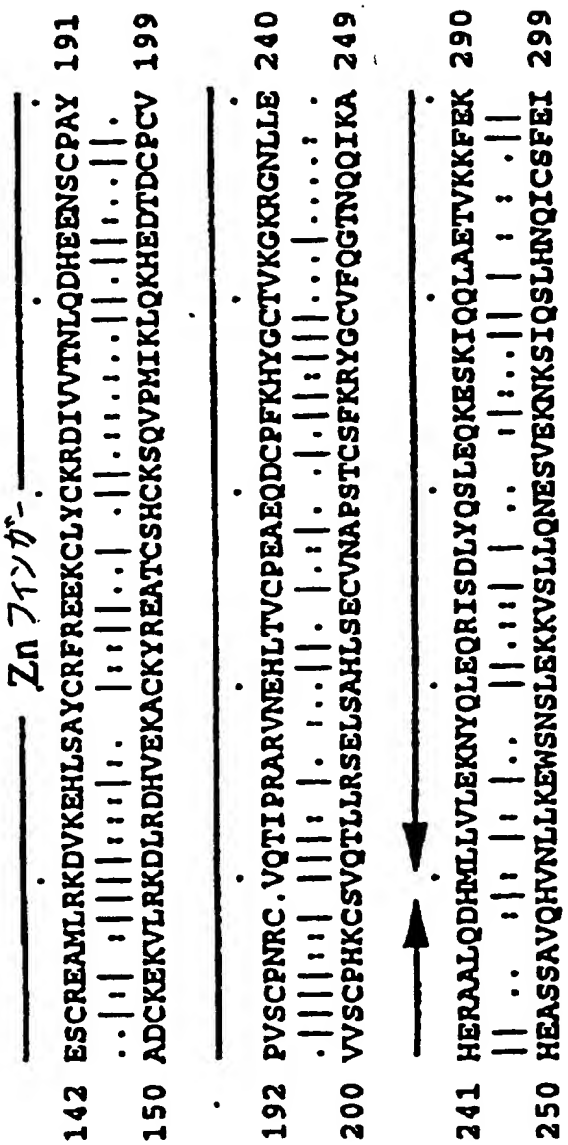
差替え用紙(規則26)

図2



差替え用紙 (規則26)

図2 (続き)



差替え用紙 (規則26)

図2（続き）

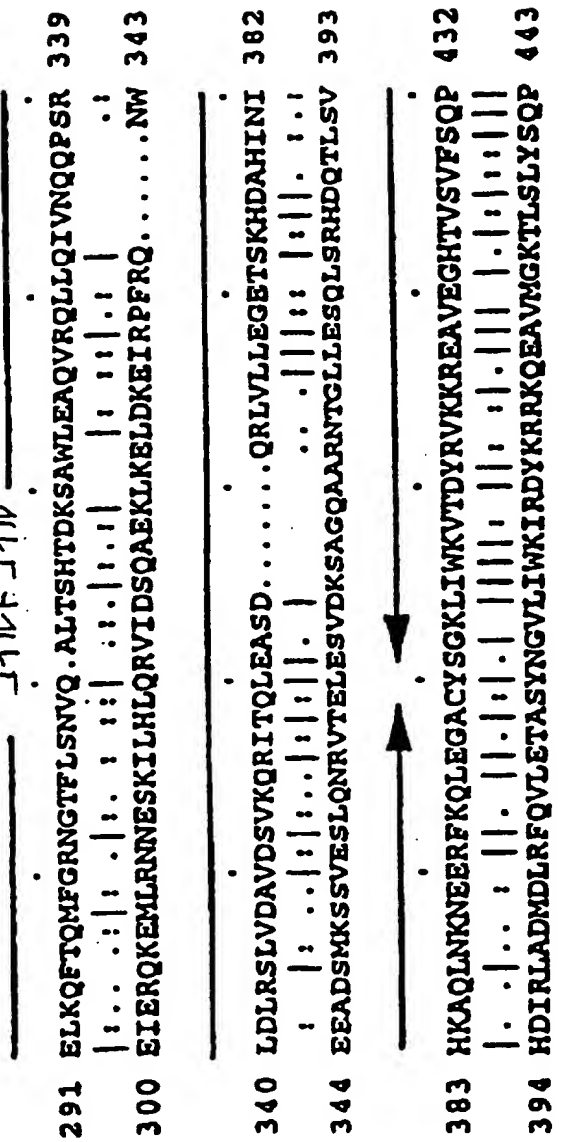

コイルドコイル
291 ELKQFTQMFGRNGTFLSNVQ.ALTSHTDKSAWLEAQVRQLLQIVNQQPSR 339
300 EIERQKEMLRNNESKILHLQRVIDSQAEKLKELDKEIRPFRQ.....NW 343
340 LDLRSLVDAVDSVKQRITQLEASD.....QRLVLLEGETSKHDAHINI 382
344 EEADSMKSSVESLQNRVTELESVDKSAGQAARNTGLLESQLSRHDQTLSV 393
383 HKAQLNKNEERFKQLEGACYSGKLIWKVTDYRVKKREAVEGHTVSVFSQP 432
394 HDIRLADMDLRFQVLETASYNGVLIWKIRDYKRRKQEAVMGKTLSLYSQP 443

図2（続き）

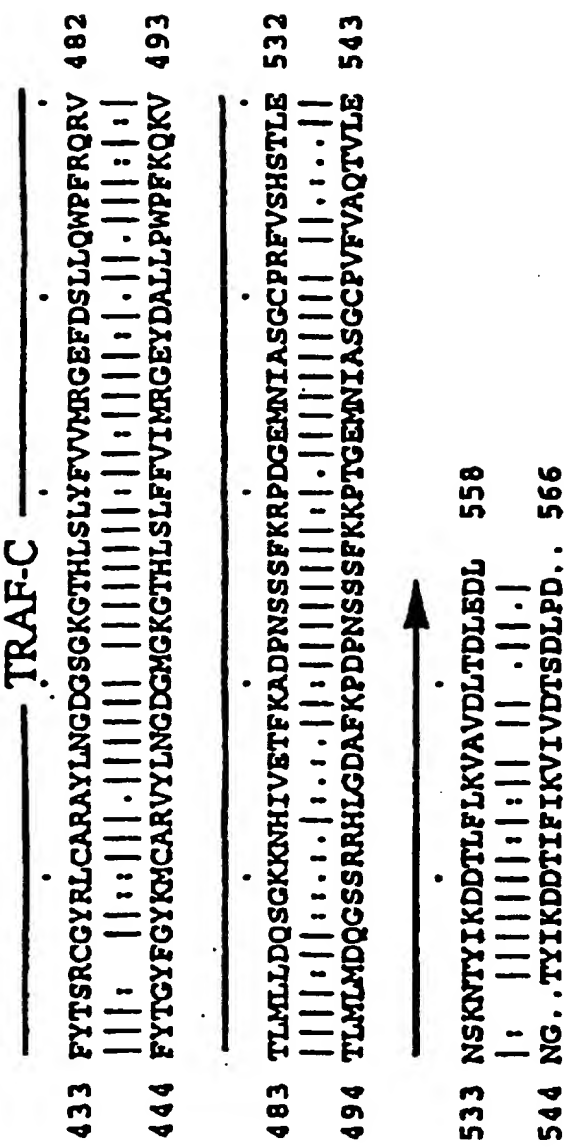

TRAF-C
433 FYTSRCGYRLCARAYLNGDGSGKGTHLSLYFVVMRGEFDSLLQWPFRQRV 482
444 FYTGYFGYKMCARVYLNGDGMGKGTHLSLFFVIMRGEYDALLPWPFKQKV 493
483 TLMLLDQSGKKNHIVETFKADPNSSSFKRPDGEMNIASGCPRFVSHSTLE 532
494 TLMLMDQGSSRRHLGDAFKPDPNSSSFKKPTGEMNIASGCPVFVAQTVLE 543
533 NSKNTYIKDDTLFLKVAVDLTDLEDL 558
544 NG..TYIKDDTIFIKVIVDTSDLPD.. 566

図3

図4

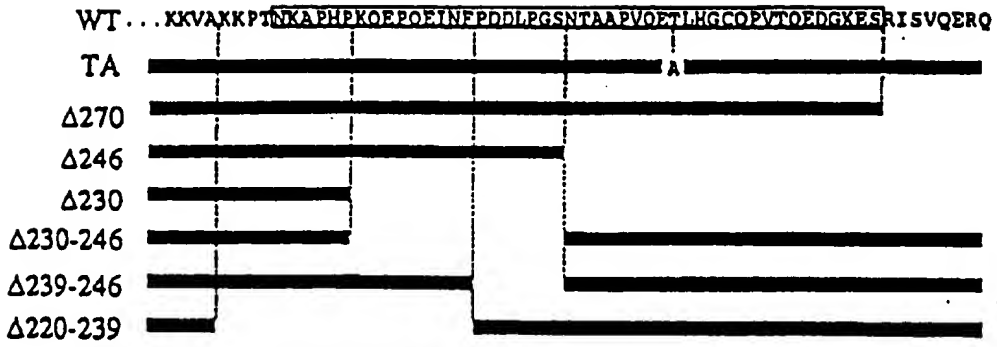

WT...XKVAXKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
TA
A
Δ270
Δ246
Δ230
Δ230-246
Δ239-246
Δ220-239

図5

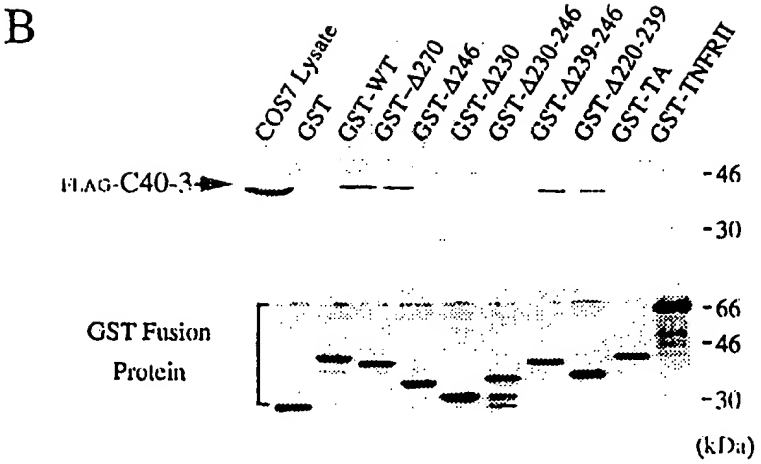
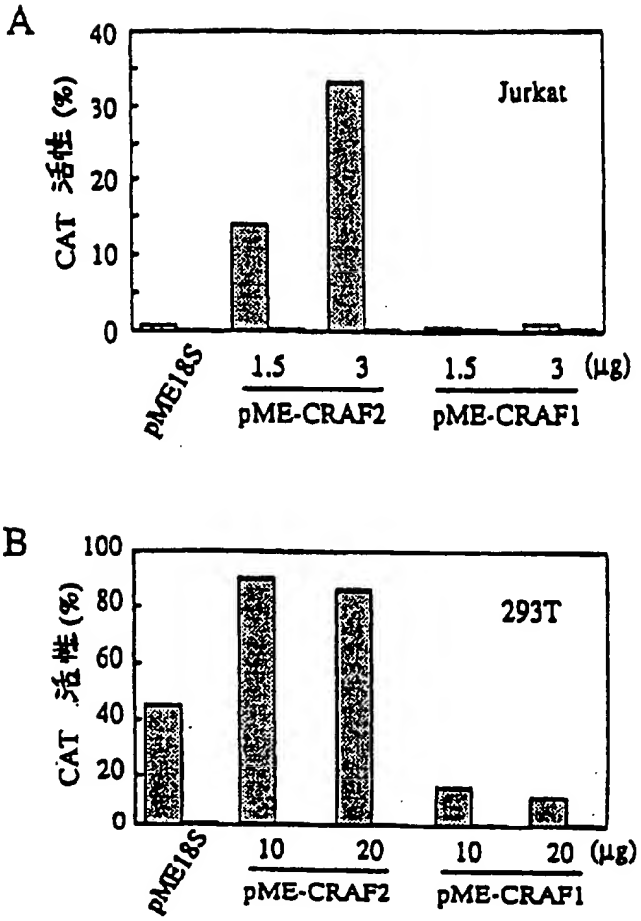

B
COS7 Lysate
GST
GST-WT
GST-Δ270
GST-Δ246
GST-Δ230
GST-Δ230-246
GST-Δ239-246
GST-Δ220-239
GST-TA
GST-TNFRII
FLAG-C40-3
-46
-30
GST Fusion Protein
-66
-46
-30
(kDa)

図6



差替え用紙 (規則26)

図7

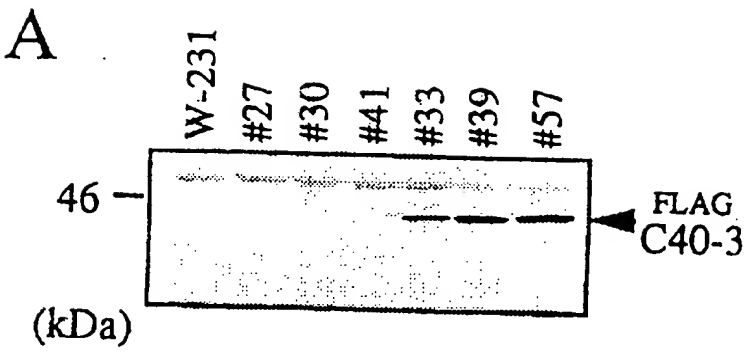
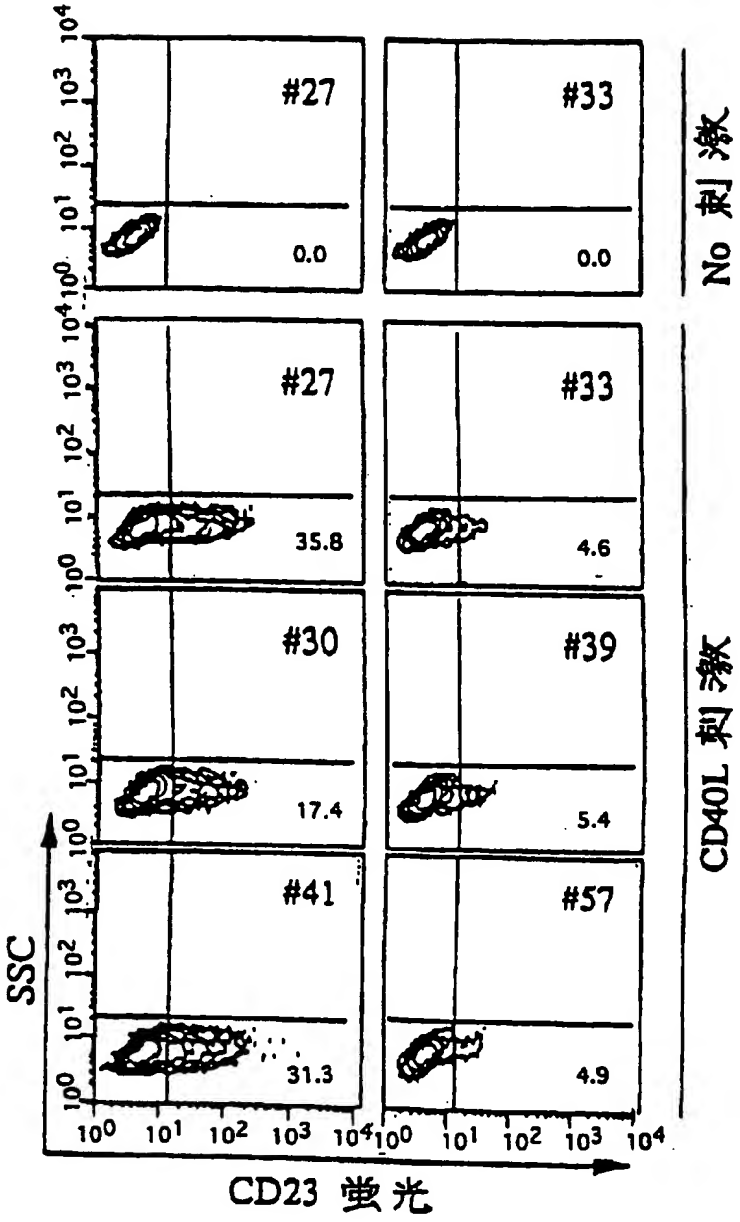


図8



差替え用紙(規則26)

図9

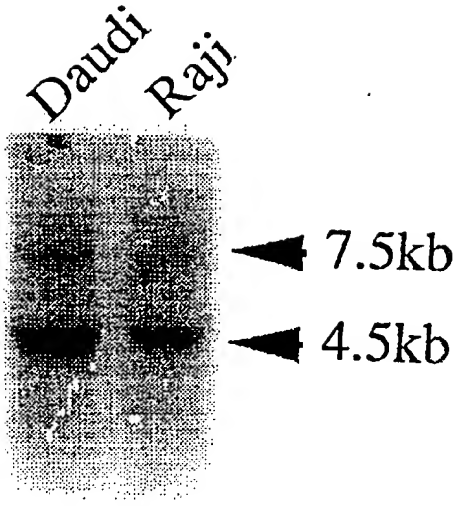
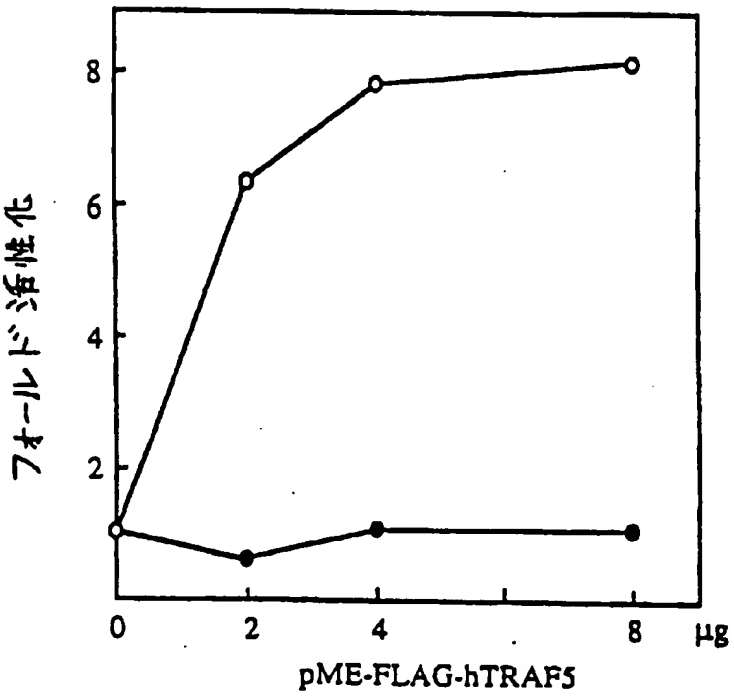


図10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/01236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl[6] C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/53, C07K14/435, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl[6] C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/53, C07K14/435, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Hiroyasu, N. et al. "TRAF5, an Activator of NF-KB and Putative Signal Transducer for the Lymphotoxin-beta Receptor" J. Biol.Chem. (1996, Jun.), Vol. 271, No. 25, p. 14661-14664	1 - 40
PX	Takaomi I. et al. "TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996, Sep.), Vol. 93, p. 9437-9442	1 - 40
PX	Inoue T. et al. "TRAF5 and TRAF6 mediate CD40 signaling" J. Allergy Clin. Immunol. (1997, Jan.) Vol. 99 1pt2 p.S470	1 - 40
A	Takaaki S. et al. "A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40" FEBS letters (1995) Vol. 358, p. 113-118	1 - 40
A	Genhong C. et al. "Involvement of CRAF1, a	1 - 40

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
July 1, 1997 (01. 07. 97)	July 8, 1997 (08. 07. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/01236

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Relative of TRAF, in CD40 Signaling" Science (1995) Vol. 267, p. 1494-1498	
A	Hong M.H. et al. "A Novel RING Finger Protein Interacts with the Cytoplasmic Domain of CD40" J. Biol. Chem. (1994) Vol. 269, No. 48, p. 30069-30072	1 - 40
PA	Takaomi I. et al. "Identificaiton of TRAF6, a Novel Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Protein That Mediates Signaling from an Amino-terminal Domain of the CD40 Cytoplasmic Region" J. Biol. Chem. (1996, Nov.) Vol. 271, No. 46, p. 28745-28748	1 - 40

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/01236

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/53, C07K14/435, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/53, C07K14/435, C07K16/18, A61K38/17, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
PX	Hiroyasu,N.et al."TRAF5,an Activator of NF-KB and Putative Signal Transducer for the Lymphotoxin-beta Receptor" J.Biol.Chem.(1996,Jun.) 第271巻 第25号 p.14661-14664	1-40
PX	Takaoni I.et al."TRAF5,a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein.mediates CD40 signaling" Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1996,Sep.) 第93巻 p.9437-9442	1-40
PX	Inoue T.et al."TRAF5 and TRAF6 mediate CD40 signaling" J.Allergy Clin.Immunol.(1997,Jan.) 第99巻 1pt2 p.S470	1-40

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 01.07.97	国際調査報告の発送日 08.07.97
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 平田 和男 印 4B 9549 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（1992年7月）

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Takaaki S. et al. "A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40" FEBS letters (1995) 第358巻 p. 113-118	1-40
A	Genhong C. et al. "Involvement of CRAF1, a Relative of TRAF, in CD40 Signaling" Science (1995) 第267巻 p. 1494-1498	1-40
A	Hong M. H. et al. "A Novel RING Finger Protein Interacts with the Cytoplasmic Domain of CD40" J. Biol. Chem. (1994) 第269巻 第48号 p. 30069-30072	1-40
PA	Takaomi I. et al. "Identification of TRAF6, a Novel Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Protein That Mediates Signaling from an Amino-terminal Domain of the CD40 Cytoplasmic Region" J. Biol. Chem. (1996, Nov.) 第271巻 第46号 p. 28745-28748	1-40

POLYGLOT INTERNATIONAL
Global Management of Language-Related Projects

340 Brannan Street, Fifth Floor
San Francisco, CA 94107 • USA

Tel (415) 512-8800
FAX (415) 512-8982

TRANSLATION FROM JAPANESE

World Intellectual Property Organization
International Patent Office

PCT

International Application Laid-Open in Accordance with Patent Cooperation Treaty

(51) Int. Cl[6]: C 12 N 15/12, C 12 P 21/02, C 12 N 1/21, 5/10, G 01 N 33/53, C 07 K 14/435, 16/18, A 61 K 38/17, 39/395

(11) International Laid-Open Patent Application (Kokai) No. **WO 97/38099**

(43) Laying-Open Date: October 16, 1997

(21) International Application No. PCT/JP 97/01236

(22) International Application Date: April 10, 1997

(30) Priority Right Data: Application No. 8/113035, April 11, 1996 JP
Application No. 8/355847, December 25, 1996 JP

(71) Applicant (for all designated countries except U.S.A.): Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. (JP/JP)

(72) Inventor; and

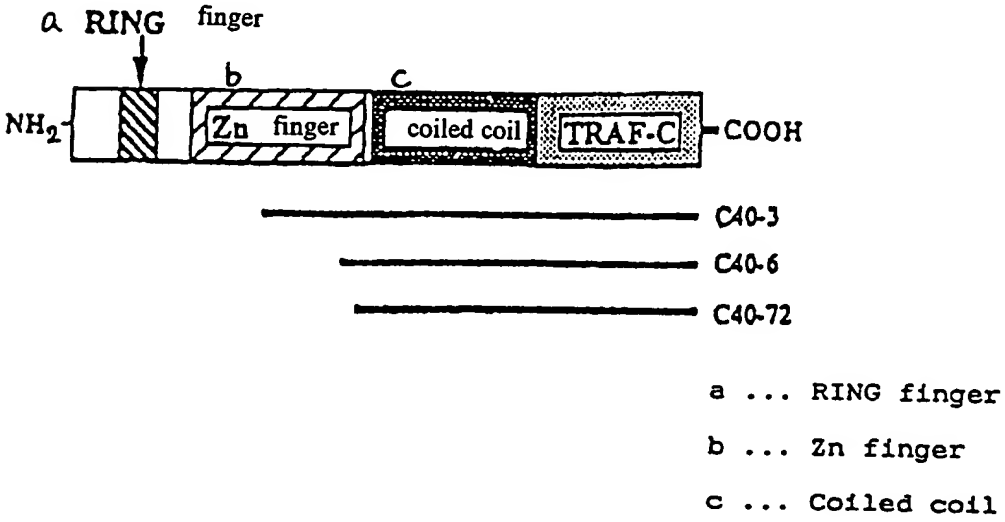
(75) Inventor/Applicant (for U.S.A. only)
Jun'ichiro Inoue (JP/JP)

(74) Agent: Masahiro Abe, Patent Attorney

(81) Designated Countries: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patents (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian Patents (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patents (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patents (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Appended Documents: International Search Report

(54) Title: **Novel Signal Transducer**



(57) Abstract:

The present invention is intended to offer the novel protein TRAF5 and polypeptides which are a part of it; DNA coding for these; antisense oligonucleotides against the DNA; anti-TRAF5 antibodies; vectors containing the DNA; transformants prepared using the vectors; a method for producing the TRAF5 and polypeptides which are a part of it; a method in which the TRAF5 and polypeptides which are a part of it are used to screen substances binding thereto, substances regulating the activity thereof, [substances] regulating the expression thereof, and the like; novel substances obtained by the screening; and various therapeutics containing them as active ingredients.

For informational purposes only
Codes used to define PCT countries added to page 1 of the pamphlet of international applications laid-open according to the PCT

AL: Albania, **AM**: Armenia, **AT**: Austria, **AU**: Australia, **AZ**: Azerbaijan, **BA**: Bosnia-Herzegovina, **BB**: Barbados, **BE**: Belgium, **BF**: Burkina Faso, **BG**: Bulgaria, **BJ**: Benin, **BR**: Brazil, **BY**: Belarus, **CA**: Canada, **CF**: Central African Republic, **CG**: People's Republic of Congo, **CH**: Switzerland, **CI**: Ivory Coast, **CM**: Cameroon, **CN**: China, **CU**: Cuba, **CZ**: Czech Republic, **DE**: Germany, **DK**: Denmark, **EE**: Estonia, **ES**: Spain, **FI**: Finland, **FR**: France, **GA**: Gabon, **GB**: Great Britain, **GE**: Georgia, **GH**: Ghana, **GM**: Gambia, **GN**: Guinea, **GR**: Greece, **HU**: Hungary, **ID**: Indonesia, **IE**: Ireland, **IL**: Israel; **IS**: Iceland, **IT**: Italy, **JP**: Japan, **KE**: Kenya, **KG**: Kyrgyzstan, **KP**: Democratic People's Republic of Korea, **KR**: Republic of Korea, **KZ**: Kazakhstan, **LC**: Saint Lucia, **LI**: Lichtenstein, **LK**: Sri Lanka, **LR**: Liberia, **LS**: Lesotho, **LT**: Lithuania, **LU**: Luxembourg, **LV**: Latvia, **MC**: Monaco, **MD**: Moldova, **MG**: Madagascar, **MK**: Macedonia (former Yugoslavia Republic), **ML**: Mali, **MN**: Mongolia, **MR**: Mauritania, **MW**: Republic of Malawi, **MX**: Mexico, **NE**: Niger, **NL**: Netherlands, **NO**: Norway, **NZ**: New Zealand, **PL**: Poland, **PT**: Portugal, **RO**: Romania, **RU**: Russion Federation, **SD**: Sudan, **SE**: Sweden, **SG**: Singapore, **SI**: Slovenia, **SK**: Slovak Republic, **SL**: Sierra Leone, **SN**: Senegal, **SZ**: Swaziland, **TD**: Chad, **TG**: Togo, **TJ**: Tadjikistan, **TM**: Turkmenistan, **TR**: Turkey, **TT**: Trinidad-Tobago, **UA**: Ukraine, **UG**: Uganda, **US**: United States of America, **UZ**: Republic of Uzbekistan, **VN**: Vietnam, **YU**: Yugoslavia, **ZW**: Zimbabwe

SPECIFICATION

NOVEL SIGNAL TRANSDUCER

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to the novel protein TRAF5 (tumor necrosis factor receptor associated factor) capable of signal transduction upon binding to CD40, polypeptides of each of the regions thereof (its partial polypeptides); DNA coding for these; an antisense oligonucleotide against the DNA; antibodies against TRAF5 and the polypeptides of each of the regions thereof; expression vectors containing the DNA; transformants prepared using the expression vectors; a method for producing the TRAF5 and the polypeptides of each of the regions thereof using the transformant; a method in which the TRAF5 and the polypeptides of each of the regions thereof are used to screen substances binding thereto, substances regulating the activity thereof, substances regulating the expression thereof, and the like; and various therapeutics.

BACKGROUND ART

B cells differentiate into antibody-producing cells through clonal proliferation based on interaction with T cells following antigen recognition. In the absence of association with antigen-specific T cells, the B cells are believed to stop proliferating, in the form of self-recognizing types, and are inactivated or lead to cell death. It has been ascertained that activity in inhibiting cell death occurs as a result of signals from CD40, and it has been suggested that CD40 plays a profound role in the control of the mechanism by which B cells are excluded in the peripheral blood (Y.-J. Liu, et al., *Nature*, **342**, 929 (1989), and T. Tubata, et al., *Nature*, **364**, 645 (1993)). CD40-mediated signals also play a role in immunoglobulin isotope switching, germinal center formation, and antibody affinity maturation (J. Banchereau, et al., *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 881 (1994)). CD40-mediated signals also induce the expression of low-affinity IgE receptor CD23 (G. Cheng, et al., *Science*, 267 (1994)), and are also known to be involved in the activation of transcription factor NFkB (I. Berberich, et al., *J. Immunol.*, **153**, 4357 (1994)).

In addition to B cells, CD40 is also expressed in B cell precursor cells, activated macrophage/monocytes, follicular dendritic cells, Langerhans's cells, thymic epithelial

cells, and various tumor cells (J. Banchereau, et al., *Annu. Rev. Immumol.*, **12**, 881 (1994)). It has been suggested that CD40-mediated signals are not only important in the activation, proliferation, and differentiation of B cells, but are also involved in antitumor activity, cytokine production, and T cell activation.

CD40 is an I type protein which has four cysteine-rich motifs in the extracellular region, and belongs to the NGFR family along with TNFR-1,2 (tumor necrosis factor receptor-1,2), Fas, OX40, and CD30.

CD40 ligands (CD40L) have also reportedly been expressed on activated T cells (R.J. Armitage, et al., *Nature*, **357**, 80 (1992)), and the CD40-CD40L system now appears to be an important information transfer system during B cell-T cell association.

Recently, TRAF1 and TRAF2, which have a TRAF (tumor necrosis factor receptor associated factor) domain, have been elucidated as signal transducers binding to the intracellular domain of TNFR-2, while CRAF1 (CD40 receptor associated factor) which is also referred to as CD40 bp, LAP-1, or TRAF-3, has been elucidated as a signal transducer binding to the intracellular domain of CD40 (Cheng, et al., *Science*, **267**, 1494 (1995)).

The inventor was recently successful in cloning mouse TRAF5, a novel signal transducer that binds to the intracellular domain of CD40 but not to TNFR-2, by a two-hybrid screening method using the intracellular domain protein of mouse CD40 (the same substance designated with the name of CRAF2 in Japanese Patent Application 8-113035 (filed on April 11, 1996) serving as the basis of the priority right of the present application, but whose name has been changed in accordance with current trends in the field). The present invention was perfected by successfully cloning human TRAF5 based on the sequence of mouse TRAF5.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

That is, the present invention relates to TRAF5 which is a novel protein that is a signal transducer binding to the intracellular domain of CD40.

The present invention also relates to TRAF5 which is a protein that binds to the intracellular domain of CD40, not to TNFR-2, and that transmits signals.

The source of the TRAF5 of the present invention is not particularly limited. Specific examples of TRAF5 in the present invention are mouse and human TRAF5, which can be characterized by the amino acid sequence, or a portion thereof, indicated by Sequence ID Nos. 1 and 4 in the Sequence Listing.

The aforementioned amino acid sequences are only specific examples of the TRAF5 of the present invention. The TRAF5 of the present invention also includes polypeptides which have an amino acid sequence that is partially different as a result of amino acid deletions, substitutions, additions, or the like, in said amino acid sequence, as long as they are proteins which bind to the intracellular domain of CD40, which do or do not bind to TNFR-2, and which transmit signals. Those that bind to sugar chains, polyethylene glycol, and the like, as well as fusion proteins and the like that bind to other proteins are also included in the TRAF5 of the present invention. The TRAF5 of the present invention is different from conventionally known TRAF1, TRAF2, and CRAF1 which have TRAF domains binding to the intracellular domain of TNFR-2 or CD40. Substances that bind to the intracellular domain of CD40 or substances that have an amino acid sequence having high homology with the aforementioned amino acid sequence and that have the characteristic of binding to the intracellular domain of CD40 and not to TNFR-2 are considered to have the function of TRAF5. The TRAF5 of the present invention thus also includes substances that have the same characteristics as mouse and human TRAF5 and that have an amino acid sequence having high homology with the aforementioned amino acid sequences or a portion thereof, such as a homology of about 60%, and particularly 80% or more. Human TRAF5 is preferred for use as the therapeutics described below.

The TRAF5 is an intracellular protein consisting of a RING finger domain, Zn finger domains, coiled coil domain, and TRAF-C domain, as indicated in the practical examples described below.

The present invention thus also relates to polypeptides which contain at least these domains or portions thereof, as well as polypeptides binding thereto.

The RING finger domain, Zn finger domains, coiled coil domain, and TRAF-C domain are located at 45 to 84, 110 to 249, 251 to 403, and 404 to 558, respectively, in the amino acid sequence indicated in Sequence ID No. 1 of the Sequence Listing, or

at 45 to 84, 110 to 249, 251 to 403, and 404 to 557, respectively, in the amino acid sequence indicated in Sequence ID No. 4 of the Sequence Listing. These, however, are only specific examples of the aforementioned polypeptides. The polypeptides of the present invention include those in which part of the amino acid sequence is different as a result of amino acid deletions, substitutions, addition, and the like, as long as they have the same functions as each of the domains. Similarly, the borders of the domains are not limited to this. The polypeptides of the present invention also include polypeptides having domains that have shifted from the domain borders several or ten some parts toward the N or C terminals, or both.

B cells producing antibodies against autoantigens are usually excluded through apoptosis, but when information from the helper T cells is sent to the B cells, this breaks down, resulting in antibody production. As such, the TRAF5 of the present invention and partial polypeptides thereof can thus be used as therapeutics for autoimmune diseases by regulating CD40 signal transduction.

B cells initially produce IgM antibodies, but CD40 signals result in antibody class switching to the production of IgG, IgA, and IgE antibodies. IgE antibodies tend to be produced in allergy diseases, and excessive antibody class switching is possibly a cause. The TRAF5 of the present invention and partial polypeptides thereof can accordingly be used as allergy therapeutics to control exacerbated IgE production by regulating CD40 signal transduction.

CD40 signals play a role in cytokine production, T cell activation and various other immune reactions or immunological diseases. The TRAF5 of the present invention and partial polypeptides thereof can accordingly be used as therapeutics having anti-cell growth action or therapeutics for various immunological diseases by regulating CD40 signals.

Methods such as encapsulation in liposomes can be used to introduce the TRAF5 protein and polypeptides of the present invention into target cells.

The present invention relates to DNA including a base sequence coding for the amino acid sequence of the TRAF5 of the present invention or partial polypeptides thereof. Such DNA includes any DNA such as chromosomal DNA and cDNA, and can be cDNA, for example. The cDNA can be obtained by common colony

hybridization, plaque hybridization, or PCR from mouse testes-derived cDNA libraries, T cell lymphoma cDNA libraries, human B cell lymphoma cDNA libraries, or the like. It can also be obtained by two-hybrid screening (G. Mosialos, et al., *Cell*, **80**, 389 (1995)). Examples of cDNA libraries that can be used in addition to the above include libraries prepared from lung, thymus, spleen, or kidney.

Specific examples of base sequences in the present invention are given in Sequence ID Nos. 2 and 5 in the Sequence Listing. As noted in the practical examples below, the DNA indicated in Sequence ID Nos. 3 and 6 in the Sequence Listing were incorporated in plasmid vectors for the transformation of *E. coli*, and the transformants were registered at the Life Sciences Research Institute in the Agency of Industrial Science and Technology.

In addition to these base sequences, the present invention includes DNA having a base sequence coding for the same amino acid sequence, which is prepared by chemical synthesis or genetic engineering, taking into consideration genetic code degeneracy.

As already noted, DNA coding for polypeptides with an amino acid sequence having high homology with the amino acid sequence of the TRAF5 of the present invention and partial polypeptides thereof is believed to hybridize with the aforementioned DNA of the present invention.

The DNA of the present invention thus includes DNA which can hybridize under highly stringent conditions with the base sequences indicated by Sequence ID Nos. 2 and 5.

The DNA of the present invention can be used to prepare TRAF5 or partial polypeptides thereof by genetic engineering. The DNA of the present invention can also be incorporated in suitable vectors and used in gene therapy. Transgenic animals, knockout animals, and the like can also be produced based on this base sequence.

The present invention also relates to an antisense oligonucleotide, and its derivatives, against the DNA of the present invention. The antisense oligonucleotide and its derivatives complementarily bind to mRNA, or portions thereof, that code for the TRAF5 of the present invention or polypeptides including each of the domains, and

inhibit the translation of these mRNAs to polypeptides, thereby inhibiting their expression.

The antisense oligonucleotides and derivatives include those that bind to the base sequence coding for TRAF5, as well as those that bind to the upstream and downstream noncoding regions.

The antisense oligonucleotides and derivatives have a base sequence that is complementary to the DNA of the present invention or portions thereof. That is, it has complementary strands of the DNA, or portions thereof, given in Sequence ID Nos. 2, 3, 5, and 6 in the Sequence Listing, for example, but uracil (U) instead of thymine (T) may serve as the base that is complementary to adenine (A).

The antisense oligonucleotide derivatives of the present invention include any having a configuration or function resembling that of oligonucleotides. Examples include substances with another substance binding to the 3' or 5' terminal of an oligonucleotide, substances substituted or repaired in at least one oligonucleotide base, sugar, or phosphate, substances having a base, sugar, or phosphate that does not occur naturally, or those having a backbone other than a sugar-phosphate backbone.

The antisense oligonucleotides and antisense oligonucleotide derivatives in the present invention can be produced by a common method (such as Stanley T. Crooke and Bernard Lebleu, Ed., in *Antisense Research and Applications*, CRC Publishers, Florida (1993)). Derivatives such as multiphosphonate or phosphothioate types can be synthesized using a chemical synthesizer (such as model 394 by Perkin-Elmer Japan). In this case, the target antisense oligonucleotide or antisense oligonucleotide derivative can be obtained by operating the chemical synthesizer in accordance with the accompanying manual, and by purifying the resulting synthetic product by reverse phase HPLC or the like.

The antisense oligonucleotides and antisense oligonucleotide derivatives of the present invention can be labeled with a radioisotope, fluorescent substance, enzyme, luminescent substance, or the like, and used to detect or measure whether or not a sample has DNA or RNA coding for TRAF5 or a partial polypeptide thereof.

When the antisense oligonucleotides and antisense oligonucleotide derivatives of the present invention are used for pharmaceutical applications, one with purity suitable for use as a medical drug should be used in a pharmacologically acceptable method of use.

For example, an antisense oligonucleotide or antisense oligonucleotide derivative in the present invention can be used as an allergy therapeutic to control exacerbated IgE production by controlling CD40 signal transduction.

An antisense oligonucleotide or antisense oligonucleotide derivative in the present invention can also be used as a therapeutic for various immunological diseases such as autoimmune diseases or as a therapeutic having anti-cell growth action by controlling CD40 signal transduction.

The aforementioned antisense oligonucleotides or antisense oligonucleotide derivatives of the present invention may be used directly dissolved or suspended in a suitable solvent, encapsulated in liposomes, or incorporated in suitable vectors.

The present invention also relates to antibodies that recognize the TRAF5 or portions thereof.

These antibodies include antibodies that specifically recognize TRAF5 or portions thereof, as well as antibodies that undergo cross-reaction with TRAF-1, TRAF-2, CRAF1, or polypeptides thereof. Antibodies that recognize only TRAF5 or portions thereof of specific species (such as humans) and antibodies that recognize TRAF5 or portions thereof of two or more species are also included.

Specific examples of antibodies are those obtained using the TRAF5 of the present invention, polypeptides of each region, or fragments thereof as antigen. The antibody of the present invention can be obtained, for example, by a method in which a suitable host is transformed by the DNA coding for the TRAF5 of the present invention described above so as to produce TRAF5, and the TRAF5 is purified from the transformants or media for use as antigen. The antibody of the present invention can also be obtained by the method described below, in which a polypeptide comprising the amino acid sequence of a portion of TRAF5 is chemically synthesized, and is allowed to bind to a carrier such as KLH (keyhole limpet hemocyanin) for use as antigen.

Antibodies recognizing full-length TRAF5 can be obtained using part of the TRAF5 as antigen, and antibodies recognizing TRAF5 or portions thereof of other species, including humans, can be obtained using mouse TRAF5 or portions thereof as antigen.

The antibody of the present invention includes both monoclonal and polyclonal antibodies. The antibodies may belong to any class or subclass. The antibodies of the present invention can be chimeric antibodies or humanized antibodies, or F(ab')2, Fab, or other such antibody fragments, as long as they recognize TRAF5 or portions thereof.

The antibodies can be produced by a common method (see, for example, *Men'eki Jikken Sosaho [Immunological Experimental Manipulation]*, published by Nihon Men'eki Gakkai). An example is briefly described below.

A suitable host is first transformed with DNA coding for the TRAF5 of the present invention described above to produce TRAF5, which is purified from the transformant cells or media, or polypeptides comprising the amino acid sequence of a portion of TRAF5 are chemically synthesized, allowed to bind to a carrier such as KLH (keyhole limpet hemocyanin), and purified to obtain antigen. Animals are inoculated and are immunized in 2 to 4 week intervals with the antigen or with the antigen and a suitable adjuvant such as Freund's complete adjuvant (FCA) or Freund's incomplete adjuvant (FIA). Following immunization, blood is drawn to obtain antiserum. A species capable of producing the target antibody is selected from rats, mice, rabbits, sheep, horses, chickens, goats, pigs, cows, and the like as the animals that are immunized. Polyclonal antibodies can be obtained by purifying the antiserum that is obtained. They can be purified by a suitable combination of common methods such as salting out, ion exchange chromatography, and affinity chromatography.

Human antibodies can be obtained by a method such as in vitro sensitization (see C.A.K. Borrebaeck, *J. Immunol. Meth.*, **123**, 157 (1989)) or methods using SCID mice (see T. Eto, *Shikiso Baiyo [Tissue Culture]*, 19, 61-65 (1993)).

Monoclonal antibodies can be obtained in the following manner. That is, antibody-producing cells such as spleen cells or lymphocytes are harvested from immunized animals and are fused with a myeloma cell line or the like by a common method using polyethylene glycol, the sendai virus, electrical pulses or the like so as to

produce hybridomas. Clones that produce antibodies binding to the TRAF5 of the present invention are then selected for culture. The monoclonal antibodies are purified from the culture supernatant of the selected clones by a suitable combination of common methods such as salting out, ion exchange chromatography, and affinity chromatography.

Genes coding for the antibodies are isolated from the hybridomas obtained in the aforementioned method and can be used to produce chimeric antibodies or humanized antibodies. For example, a gene coding for a constant portion of mouse antibody can be substituted by a gene coding for a constant portion of human antibody, and the reconstructed gene can be expressed in animal cells to obtain chimeric antibodies. Humanized antibodies can be obtained by reorganizing genes so as to code for antibodies in which complementarity determining regions (CDR) have been substituted by CDRs of mouse antibodies, and by expressing them in animal cells (Carte, et al., *Pro. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 89, p. 4285 (1992)).

The antibodies can be so-called neutral antibodies, for example, which inhibit the CD40 signal transduction of TRAF5. The neutral antibodies include both those that completely suppress TRAF5 activity and those that partially suppress it.

The antibodies of the present invention can be labeled with radioisotopes, fluorescent substances, enzymes, luminescent substances, and the like to detect the production of TRAF5 or its degradation products in humors and tissue. As noted earlier, TRAF5 is believed to be related to CD40 signal transduction, so the ability to determine the presence or absence of TRAF5 in tissue or blood could allow the degree to which a disease has advanced or the prognosis to be determined, or the therapeutic effects to be confirmed. The antibodies can also be used to prepare antibody columns that are used to purify TRAF5, and to detect TRAF5 in fractions during purification.

Among the antibodies of the present invention, neutral antibodies can be used as therapeutics for various immunological diseases such as autoimmune diseases by inhibiting or regulating CD40 signal transduction.

The neutral antibodies of the present invention can also be used as allergy therapeutics to control exacerbated IgE production by regulating CD40 signal transduction.

The present invention also relates to a vector including the aforementioned DNA. In addition to the aforementioned DNA, the vector of the present invention may also include as needed sequences well-known to those in the field, such as enhancer sequences, promoter sequences, ribosome-binding sequences, base sequences used to amplify the number of copies, base sequences coding for signal peptides, base sequences coding for other polypeptides, poly-A addition sequences, splicing sequences, replication origins, and base sequences for genes serving as selective markers.

Vectors can be prepared by incorporating DNA coding for TRAF5 or a portion thereof into any vector by a method well-known to those in the field (see, for example, J. Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)). Suitable examples of DNA coding for TRAF5 or portions thereof include the base sequences, and portions thereof, noted in Sequence ID Nos. 2 and 5 in the Sequence Listing. Vectors can be selected as desired from pUC118, pBR322, pSV2-dhfr, pBluescript II, pHIL-S1, λZapII, λgt10, pAc700, YRP17, pEF-BOS, pEFN-II and other such plasmid vectors, phage vectors, virus vectors, and the like. Suitable examples of vectors include expression vectors which have a sequence such as a promoter necessary for expression in addition to the DNA coding for TRAF5 or a portion thereof, and which are capable of expressing TRAF5 or a portion thereof. Such expression vectors can be used to produce TRAF5 or portions thereof by genetic engineering.

The present invention relates to transformants obtained by transformation using the aforementioned vectors. Transformants can be obtained by the transformation of suitable host cells with the aforementioned vectors using a common method (see *Jiken Igaku Rinji [Experimental Medicine in the Clinic]*, Supplemental Issue, *Idenshi Kogaku Handobukku [Handbook of Genetic Engineering]*, published March 20, 1991, by Yodosha). The host cells that are used can be selected as desired from prokaryote cells such as *Bacillus subtilis* or *E. coli*, or eukaryote cells such as animal cells, insect cells, or yeast. Suitable examples of transformants in the present invention are transformants that have been obtained using *E. coli*, yeast, or CHO cells as hosts, and transformants that express the TRAF5 of the present invention or portions thereof.

The present invention also relates to a method for producing polypeptides including the TRAF5 of the present invention or portions thereof, which includes the step of culturing the aforementioned transformants.

In this method, transformants of the present invention are first cultured, and the genes are amplified or their expression induced as needed. The transformants can be cultured or their expression induced by a common method (see, for example, *Biseibutsu Jikkenho [Microbial Test Methods]*, Ed. Nihon Seikagakkai, by Tokyo Kagaku Dojin (1992)). The cultured mixture, that is, the culture supernatant or cells, are then recovered, the material is treated as needed by concentration, solubilization, dialysis, and various types of chromatography such as that featuring an affinity column using the antibodies of the present invention, for example, and polypeptides including the TRAF5 of the present invention or portions thereof are purified.

In this method, the polypeptides of the present invention may be produced, by transformants, in the form of fusion proteins with other polypeptides. When the protein is expressed in the form of a fusion protein with another protein, the fusion protein is treated with a chemical substance such as bromocyan or an enzyme such as a protease at any step during the purification process so as to cut out the protein.

The present invention also relates to a method in which the TRAF5 of the present invention or partial polypeptides thereof or antibodies against these are used to screen substances binding thereto, substances regulating the activity thereof, substances regulating the expression thereof, or the like.

For example, TRAF5 or a partial polypeptide thereof, or CD40 or a partial polypeptide thereof, can be used to screen substances that bind to TRAF5 or partial polypeptides thereof, or substances that inhibit binding between TRAF5 or partial polypeptides thereof and CD40 or partial polypeptides thereof. Fusion proteins of TRAF5 or a partial polypeptide thereof and a FRAG epitope can be prepared by a common method, for example (such as T. Ishida, et al., *Pro. Nat. Acad. Sci.*, Vol 93, p. 9437 (1996)). Fusion proteins of CD40 or a partial polypeptide thereof and GST can also be prepared. After these fusion proteins and a screening substance have been mixed, a substance that inhibits binding between TRAF5 or a partial polypeptide thereof and CD40 or a partial polypeptide thereof can be selected by a common method (T. Ishida, et al., *Pro. Nat. Acad. Sci.*, Vol 93, p. 9437 (1996)).

Two-hybrid screening can also be adopted to select substances that inhibit binding between TRAF5 or a partial polypeptide thereof and CD40 and a partial polypeptide thereof. For example, an expression vector capable of expressing the CD40 intracellular domain in a form that is fused with the DNA-binding domain of bacteria repressor LexA can be prepared by a common method (T. Ishida, et al., *Pro. Nat. Acad. Sci.*, Vol 93, p. 9437 (1996)). An expression vector capable of expressing TRAF5 or a partial polypeptide thereof in a form that is fused with the yeast protein GAL4 can also be prepared. These expression vectors are introduced to the yeast L40 line (A.B. Vojtek, et al., *Cell*, Vol. 74, p. 205 (1993)) by a common method (T. Ishida, et al., *Pro. Nat. Acad. Sci.*, Vol 93, p. 9437 (1996)) to prepare transformants. Substances that inhibit binding between TRAF5 or partial polypeptides thereof and CD40 or partial polypeptides thereof can be selected by adding screening substances to the transformants, and by assaying the histidine dependency and β-galactosidase activity by a common method (T. Ishida, et al., *Pro. Nat. Acad. Sci.*, Vol 93, p. 9437 (1996)).

Screening can be done by a common method (T. Ishida, et al., *Pro. Nat. Acad. Sci.*, Vol 93, p. 9437 (1996)) using the NFkB activating action of TRAF5 as an index. TRAF5 expression vectors and reporter plasmids for assessing NF-kB activation are introduced into human Jurkat cells or human 293 T cells, for example. Substances that regulate the NFkB activation action of TRAF5 or partial polypeptides thereof can be selected by adding screening substances at this time, and by assaying the expression of the reporter gene.

Substances that regulate the expression of TRAF5 or partial polypeptides thereof can also be screened. An example of a method is one in which screening substances are added to B cells, and the expression of TRAF5 or partial polypeptides thereof is assayed using antibodies against the TRAF5 of the present invention.

The TRAF5 and partial polypeptides thereof can also be used to screen substances binding thereto or substances that regulate the activity thereof by the following method.

That is, TRAF5 or partial polypeptides thereof, or CD40 or partial polypeptides thereof, are first mass produced and purified, and are then crystallized. They can be

crystallized by a common method (such as *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach*, Ed. A. Ducruix and R. Giege, IRL Press at Oxford University press (1992)).

X-ray analysis can then be undertaken by a common method (such as *Methods in Enzymology*, Vol. 114, Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A, Ed. Harold W. Wyckoff, C.H.W. Hirs, and Serge N. Timasheff, Academic Press, Inc., (1985)) to learn the three-dimensional structure of the TRAF5 or partial polypeptides thereof, or the three-dimensional structure of the binding between the TRAF5 or partial polypeptides thereof.

The resulting three-dimensional structure can then be analyzed by a common method (such as *Methods in Enzymology*, Vol. 115, Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part B, Ed. Harold W. Wyckoff, C.H.W. Hirs, and Serge N. Timasheff, Academic Press, Inc., (1985)).

The analyzed data thus obtained for the three-dimensional structure of the TRAF5 or partial polypeptides thereof, or the three-dimensional structure of the binding between the TRAF5 or partial polypeptides thereof, can then be used for the screening or molecular design of substances that bind to TRAF5 or partial polypeptides thereof, substances that inhibit binding between these and CD40 or partial polypeptides thereof, substances that inhibit the activity thereof, or the like by a common method (such as Ludi, Molecular Simulations Inc., or Dock, Kunts Group, University of California San Francisco).

The present invention thus also relates to novel substances obtained by such screening.

The aforementioned substances that bind to the TRAF5 or partial polypeptides thereof, substances that inhibit the activity thereof, or substances that regulate the expression thereof can be used as therapeutics having anti-cell growth action or as therapeutics for various immunological diseases such as autoimmune diseases by regulating the CD40 signal transduction.

They can also be used as allergy therapeutics to control exacerbated IgE production by controlling CD40 signal transduction.

Active ingredients of the various therapeutics of the present invention may be those that have undergone pharmaceutically acceptable chemical modification or those that have resulted in the formation of salts, provided that the basic activity is not thereby lost. Examples include salts of inorganic acids such as hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, and sulfuric acid, and salts of organic acids such as maleic acid, succinic acid, malic acid, and tartaric acid.

The therapeutics (medicinal compositions) of the present invention can be used by any route of administration, such as oral administration, transdermal administration, intravenous administration, intramuscular administration, intraperitoneal administration, subcutaneous administration, intradermal administration, and enteral administration.

The therapeutics of the present invention can be formulated by a method well-known to those in the field depending on the route of administration, and can include pharmacologically acceptable auxiliary components (such as excipients, fillers, expanders, binders, humectants, disintegrators, surfactants, dissolution assistants, buffers, analgesics, preservatives, and stabilizers). When the therapeutic is an injection, it can include gelatin or human serum albumin, polyethylene glycol or other such stabilizers, D-mannitol, D-sorbitol, glucose and other such alcohols, or saccharides, Polysorbate 80 (TM) and other such surfactants.

The dosage of the therapeutics (medicinal compositions) of the present invention for humans varies depending on the patient's condition and age, or the method of administration, but the therapeutics can be used, for example, in a dosage of about 0.01 to 100 mg/kg/day, and preferably about 0.1 to 10 mg/kg/day. The period of administration is not particularly limited. Depending on the patient's condition or the like, the therapeutics can be administered continuously in the form of drops as needed, divided over a suitable number of times, or by single administration.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts three clones specifically binding to the domains of TRAF5 and the intracellular domain of CD40.

Figure 2 depicts a comparison of the amino acid sequences of TRAF5 and CRAF1.

Figure 3 shows the results of electrophoresis in Northern blotting of TRAF5 mRNA by tissue.

Figure 4 shows the amino acid sequence of the intracellular domain of CD40 (from K at 216 to Q at 277) and that of its mutant.

Figure 5 is a photograph of the results of electrophoresis in Western blotting and in SDS-PAGE for immune complexes obtained from fusion proteins of TRAF5 and the CD40 intracellular domain, and of its mutant and GST.

Figure 6 shows the signal transduction activity of TRAF5 and CRAF1 using Jurkat cells and 293 T cells.

Figure 7 is a photograph of the results of electrophoresis in Western blotting of mouse WEHI231B cell transformants.

Figure 8 shows the results of activity in inducing expression of CD23 using FACS.

Figure 9 is a photograph of electrophoresis showing Northern blotting of human TRAF5 mRNA in the human B cell lymphoma cell lines Daudi and Raji.

Figure 10 shows the TRAF5 signal transduction activity using 293 cells.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The present invention is described in greater detail below with reference to practical examples of preferred embodiments of the present invention, but these practical examples do not in any way limit the present invention.

The abbreviations used in the following description are based on commonly used abbreviations in the technical field.

The operations in the following practical examples were carried out for the most part with reference to Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); and Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.

Practical Example 1: Obtaining DNA Coding for Mouse TRAF5

(1) Screening

Screening was done by two-hybrid screening to clone the cDNA of proteins binding to the intracellular domain of mouse CD40. Two-hybrid screening is an experimental method in which the capacity for forming complexes between two fusion proteins is searched using the transcription activation in budding yeast cells.

A mouse C57 Black Kaplan T cell lymphoma cell line V13 cDNA library prepared using the expression vector pACT was procured from Clontech. This library is capable of expressing cDNA in the form of fusion proteins with the active domain of the yeast protein GAL4.

Expression vectors capable of expressing the intracellular domain of mouse CD40 in a form fused with the DNA-binding domain of LexA (a bacteria repressor) were constructed in accordance with the following procedure. DNA fragments coding for the mouse CD40 intracellular domain (R.M. Torres, et al., *J. Immunol.*, Vol. 148, pp. 620-626 (1992), from the Lys at amino acid No. 216 to the Phe at 305) were first prepared by PCR according to the following procedure. 5'-GCGGATCCTCAAAAAGGTGGTCAAGAAACCAAAG-3' was first synthesized as sense primer, and 5'-GCGTCGACTCAAAAGGTCAGCAAGCAGCCATC-3' was synthesized as antisense primer. The primers, mouse WEHI-231 B cell cDNA (as template), and Taq polymerase and its reaction reagent (by Toyobo) were then mixed. A reaction was brought about using a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer) for 1 minute at 95°C, 2 minutes at 55°C, and 3 minutes at 72°C. These operations were undertaken for 30 cycles, and the amplified product (around 280 bp) was collected. The product was cleaved with BamHI and SalI, and then inserted at the BamHI-SalI restriction enzyme site of the plasmid pBTM116 (P.L. Bartel et al., in *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, Ed. D.A. Hartley, pp. 153-179, Oxford University Press, Oxford (1993)).

The yeast L40 line (A.B. Vojtek, et al., *Cell*, Vol. 74, p. 205-214 (1993)) can be grown in histidine-deficient media, characteristically resulting in positive β-glalactosidase activity, when the HIS3 and lacZ reporter genes are incorporated into the genome, and when the GAL4 active domain/cDNA expression product fusion protein binds to the LexA-binding domain/CD40 intracellular domain fusion protein in the cells.

pBTM40cyt was introduced into the yeast L40 line using lithium acetate, resulting in transformants in which the LexA-binding domain/CD40 intracellular domain fusion protein had been expressed. This transformant was designated L40C40. 2×10^6 clones of the aforementioned cDNA library were introduced into L40C40 transformants using lithium acetate to inoculate histidine-deficient media. Clones appearing after 7 days of culture at 30°C were isolated. The clones were searched for β-galactosidase activity in accordance with the protocol accompanying the aforementioned cDNA library, resulting in the selection of 72 clones in which β-galactosidase activity could be detected by 20 minutes of incubation.

Plasmids were extracted from each of the yeast colonies for Southern blotting using CRAF1 and TRAF2 cDNA as probes in order to remove the cDNA clones of CRAF1 or TRAF2, which were already known to be capable of being selected by the same screening system, from the above clones. The result was that 10 clones did not hybridize with either of the two probes. Plasmids containing cDNA were recovered from these clones. These plasmids, along with pBTM40cyt or the LexA-binding domain/human Iamin C fusion protein expression vector pBTMLamin (see A.B. Vojtek, et al., *Cell*, Vol. 74, pp. 205-214 (1993)), were introduced into the yeast L40 cell line using lithium acetate, resulting in 4 clones which grew in histidine-deficient media only when introduced with pBTM40cyt, and in which β-galactosidase activity could be detected under the aforementioned conditions. Of these, 3 clones (C40-3, C40-6, and C40-72) had cDNA coding for a portion of the same protein (Figure 1).

cDNA fragments of C40-3, which had the longest cDNA fragments (about 1 kbp) of the 3 clones, were used as probe in plaque hybridization screening of a mouse testes-derived cDNA library prepared by a common method using λZAPII vectors (by Strategene). Two clones were obtained, resulting in the recovery of pBluescript plasmids in which the cDNA fragments had been inserted by in vivo excision. The

cDNA fragment bases were sequenced by the BcaBest Sequence System (by Takara Shuzo). The clone with the longest cDNA fragments had 2105 bp cDNA fragments (Sequence ID No. 3 in the Sequence Listing). The plasmid with this cDNA inserted in pBluescript was designated pBSCRAF2 (pBSTRAF5).

The *E. coli* line NM522 was transformed with pBSCRAF2 (pBSTRAF5) by a common method, and the resulting transformant *E. coli* NM522 (pBSCRAF2) was registered (FERM P-15531) on March 27, 1996, at the Life Sciences Research Institute in the Agency of Industrial Science and Technology of the Ministry of Trade and Industry, at 1-1-3 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Prefecture, Japan. The bacterial strain was subsequently transferred on March 6, 1997 to the International Registry in accordance with the Budapest Treaty, and was designated FERM BP-5856.

(2) Analysis of TRAF5 Structure

The structure of the TRAF5 was analyzed on the basis of the DNA sequence determined in (1) above. The TRAF5 was consequently assumed to consist of a protein comprising 558 amino acid residues (Signal ID No. 1 in the Sequence Listing). A search of homologies using the PIR data base revealed the highest homology with CRAF1, as shown in Figure 2. A TRAF-C domain was present in the C terminal region of TRAF5 (see Figure 2). The TRAF-C domain is a motif in common to the aforementioned CRAF1 or TRAF1 and TRAF2 which are known to bind to the intracellular domain of TNFR-2, and is known to play a role in the interaction with other proteins. In addition to the TRAF-C domain, TRAF5 has a RING finger domain, five Zn finger domains, and a coiled coil domain, in that order, beginning from the N terminal (Figure 1).

(3) Northern Blotting

The complete RNA of various types of tissue was prepared by the guanidine isothiocyanate/acid phenol method (P. Chomczynski and N. Sacchi, *Anal. Biochem.*, Vol. 162, pp. 156-159 (1987)), and poly $(A)^+$RNA was then purified using oligo (dT) latex (by Takara Shuzo). 7 μg poly $(A)^+$RNA was then electrophoresed using 1% agarose gel containing 6.6% formaldehyde, and blotted using nylon membranes (by Amersham). Probe was prepared by labeling the cDNA fragments of the C40-3 clones with ^{32}P. The aforementioned nylon membranes were incubated at

65°C in the probe and hybridization buffer (0.2 M $NaHPO_4$ (pH 7.2), 1 mm EDTA, 1% (W/V) BSA, 7% (W/V) SDS). The filter was finally washed for 30 minutes at 65°C with 0.5 × SSC/0.2% (W/V) SDS, and autoradiography was performed. The results are given in Figure 3.

The detection of TRAF5 mRNA by tissue was pronounced with lung, moderate with thymus, spleen, and kidney, and weak with brain and liver. No TRAF5 mRNA was detected by Northern blotting of skeletal muscle, heart, small intestine, or testes, however. It was confirmed that the TRAF5 mRNA was about 2.2 kb, and that the resulting TRAF5 cDNA was virtually full-length.

Practical Example 2: Determination of CD40 Region necessary for Binding to TRAF5

Plasmids coding for a mutant of human CD40 intracellular domain (I. Stamenkovic, et al., *EMBO J.*, Vol. 8, pp. 1403-1410 (1989): Figure 4) were prepared by the method of Kunkel (T.A. Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82, pp. 488-492 (1985)). DNA coding for human CD40 intracellular domain and that coding for its mutant, as well as DNA coding for human TNFR-2 intracellular domain (C.A. Smith, et al., *Science*, Vol. 248, pp. 1019-1023 (1990): from the Lys at amino acid No. 288 to the Ser at 461), were subcloned to the GST fusion protein expression vector pGEX2T (by Pharmacia LKB), and the resulting plasmids were used to transform *E. coli* BL21. Figure 4 shows the mutant locations of the human CD40 intracellular domain encoded by the expression vectors.

GST, fusion proteins of GST/CD40 intracellular domain or its mutant, and GST/TNFR-2 fusion protein (GST-TRNFRII) were prepared in accordance with the method of Smith et al (D.B. Smith and K.S. Johnson, *Gene*, vol. 67, pp. 31-40 (1988)), and the resulting proteins were fixed to glutathione agarose beads (0.2 mg/mL). 2 μL of the bead solution was electrophoresed using 12.5% polyacrylamide/SDS gel, and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The results are shown at the bottom of Figure 5.

DNA coding for protein (FLAG-C40-3) with a FLAG epitope (see that by Eastman Kodak) added to the N terminal of protein encoded by C40-3 cDNA was inserted downstream of the SRα promoter of the expression vector pME18S (see

special Experimental Medicine issue, *BioManual Series 4*, Gene Introduction, Expression, and Analysis, published April 20, 1994, by Yodosha).

10 μg pME-FLAG-C40-3 was used for transfection of 10^6 COS7 cells. 36 hours after the expression vectors had been introduced, the cells were harvested, lysed with TNE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1% (W/V) NP-40, 0.15 M NaCl, 10 mM iodoacetoamide, 1 mM EDTA, 10 μg/mL aprotinin), and then centrifuged. Half of the supernatant was incubated for 1 hour at 4°C with the aforementioned glutathione agarose beads on which 1 μg protein had been fixed, and the beads were then washed, and were boiled in the presence of 0.1% SDS. Immunoprecipitation was then effected using anti-FLAG antibody M2 (by Eastman Kodak), and the immune complexes were electrophoresed using 12.5% polyacrylamide/SDS gel. This was followed by Western blotting in accordance with a common method using anti-mouse IgG antibodies labeled with alkali phosphatase and the anti-FLAG antibody M2. The results are given at the top of Figure 5.

The GST/CD40 intracellular domain fusion protein (GST-WT) was seen to bind efficiently to the FLAG-C40-3. The GST protein used as a negative control did not bind to the FLAG-C40-3, thus confirming the binding specificity of the test system. The capacity of the mutant (in which the Thr at 254 of CD40 was mutated to Ala (GST-TA: Figure 4)) for binding to FLAG-C40-3 was considerably lower than that of GST-WT. It was already known that this mutation results in the loss of human CD40-mediated growth inhibition signaling (S. Inoue, et al., *Eur. J. Immunol.*, Vol. 20, pp. 1747-1753 (1990). In the case of the various other deletion mutants of human CD40 intracellular domain, GST-Δ270 (Figure 4 shows the deletion from the Arg at amino acid No. 270 to the Gln at 277) was seen to bind to FLAG-C40-3 at about the same level as GST-WT, while GST-Δ230 (Figure 4 shows the deletion from the Lys at amino acid No. 230 to the Gln at 277) and GST-Δ246 (Figure 4 shows the deletion from the Asn at amino acid No. 246 to the Gln at 277) were virtually unable to bind to FLAG-C40-3. Compared to GST-Δ230 and GST-Δ246, GST-Δ230-246 (Figure 4 shows the deletion from the Lys at amino acid No. 230 to the Ser at 245) could bind somewhat to FLAG-C40-3. GST-Δ239-246 (Figure 4 shows the deletion from the Pro at amino acid No. 239 to the Ser at 245) and GST-Δ220-239 (Figure 4 shows the deletion from the Lys at amino acid No. 220 to the Phe at 238) showed about the same level of binding activity as GST-WT.

The above results demonstrate that the region between the Asn at amino acid No. 246 and the Ser at 269 for human CD40 shown in Figure 4 is essential to binding to TRAF5 but that it is not enough, the region between the Lys at amino acid No. 230 and the Pro at 239 in Figure 4, or the region between the Pro at amino acid No. 239 and the Asn at 246 in Figure 4, also being necessary for efficient binding to TRAF5. Although the three-[dimensional] structure of the intracellular domain of CD40 cannot yet be elucidated very well, it is assumed that TRAF5 recognizes the structure along the region from the Lys at amino acid No. 230 to the Ser at 269 in Figure 4. It has also been reported that CRAF1 is capable of weak binding to TNFR-2 (G. Mosialos, et al., *Cell*, Vol. 80, pp. 389-399 (1995)). The top of Figure 5, however, shows that GST-TNFRII (TNFR-2) does not bind to FLAG-C40-3. It may thus be seen that TRAF5 does not bind to TNFR-2.

Practical Example 3: Confirmation of TRAF5 Signal Transduction Activity

(1) Confirmation of NFkB Activation Action

Human Jurkat T cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS. Human 293 T nephrocytes were also cultured in DMEM containing 10% FBS.

CRAF1 cDNA was prepared by PCR in accordance with the following procedures. 5'-CTCCTCGAGATGGAGTCGAGTAAAAAGATGGAC-3' was first synthesized as sense primer, and 5'-CTTACTAGTTCAGGGATCGGGCAGATCCGAAGT-3' was synthesized as antisense primer. The primers, mouse spleen cDNA (as template), and Taq polymerase and its reaction reagent (by Toyobo) were then mixed. A reaction was brought about using a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer) for 1 minute at 95°C, 2 minutes at 55°C, and 3 minutes at 72°C. These operations were undertaken for 30 cycles, and the amplified product (around 1500 bp) was collected. The product was cleaved with XhoI and SpeI, and then inserted at the XhoI-SpeI restriction enzyme site of the expression vector pME18S. The resulting plasmids were designated pME-CRAF1. TRAF5 cDNA was inserted at the EcoRI-NotI restriction enzyme site of the expression vector pME18S. The resulting plasmids were designated pME-TRAF5 (pME-CRAF2).

$[kB]_6$TK-CAT (J. Inoue, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 88, 3715-3719 (1991)) in which CAT is expressed depending on the kB site serving as the NF-kB binding site was used as a reporter plasmid to assess transcription factor NF-kB activity. $[kBM]_6$TK-CAT with a mutated kB site (J. Inoue, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 88, 3715-3719 (1991)) was used as a negative control reporter plasmid to confirm the kB specificity in CAT expression. β-actin-β-gal in which β-galactosidase is expressed under the control of the β-actin promoter was used as a reporter plasmid to assess the efficiency with which the DNA was introduced into cells.

Expression plasmids were introduced into the human Jurkat T cells by the following procedure. 1 μg reporter plasmid ($[kB]_6$TK-CAT or $[kBM]_6$TK-CAT), 1 μg β-actin-β-gal, and 1.5 μg or 3 μg pME-CRAF1 or pME-TRAF5 were mixed. pME18S was added to bring the total amount of DNA to 5 μg for transfection of 2×10^6 cells by the DEAE-dextran method.

The expression plasmids were introduced to the human 293 T nephrocytes by the following procedure.

1 μg reporter plasmid ($[kB]_6$TK-CAT or $[kBM]_6$TK-CAT), 1 μg β-actin-β-gal, and 10 μg or 20 μg pME-CRAF1 or pME-TRAF5 were mixed. pME18S was added to bring the total amount of DNA to 22 μg for transfection of 2×10^6 cells by the DEAE-dextran method for transfection of 10^6 cells by the calcium phosphate method.

The cells were harvested following 48 hours of transfection, and centrifuged following thawing to prepare a cell extract solution.

The transfection efficiency was standardized by assaying β-galactosidase activity using a common method (P. Herbomel, et al., *Cell*, Vol. 39, 653-662 (1984)).

The CAT activity was assayed during a reaction for 1 hour at 37°C by a common method (C.M. Gorman, et al., *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 2, pp. 1044-1051 (1982)). The results are shown in Figure 6.

The TRAF5 resulted in dose-dependent activation of the transcription of kB site dependency in the human Jurkat T cells (A). No such activity was noted with CRAF1. The TRAF5 activated NFkB in the human 293 T nephrocytes (B) as well. However,

the dose dependency was not as marked as that noted in the human Jurkat T cells. This was because the NFkB was already activated despite the absence of any stimulation in the 293 T cells. The already activated NFkB was controlled by CRAF1 overexpression. That is, the TRAF5 and CRAF1 showed reciprocal activity, relative to the effects on NFkb activation based on this overexpression.

(2) Confirmation of Dominant Negative Mutant Activity in Suppressing CD23 Expression

Mouse WEHI-231B cells were transfected with pME-FLAG-C40-3 and the puromycin resistance gene expression plasmid pApuro (M. Takata, et al., EMBO J., Vol. 13, pp. 1341-1349 (1994)), and puromycin resistant strains were selected in the presence of 0.5 μg/mL puromycin to obtain transformants.

The expression of FLAG-C40-3 was checked by Western blotting of #27, #30, #41, #33, #39, #57, and the novel strain WEHI-231 among the transformants, in the same manner as in Practical Example 2. FLAG-C40-3 expression could thus be confirmed in #33, #39, and #57 (Figure 7). FLAG-C40-3 expression could not be confirmed in #27, #30, #41, and WEHI-231 B cells (Figure 7). All transformants expressed the normal level of mouse CD40.

These transformants were stimulated for 48 hours with mouse CD40L-CD8 chimeric protein (P. Lane, et al., *J. Exp. Med.*, Vol. 177, pp. 1209-1213 (1993)). As a stimulation-free control, culture medium was added instead of stimulant. The cells were then stained using FITC-labeled anti-CD23 antibodies, and analyzed using the Lysis II program in accordance with the instructions for FACScan (by Beckton Dickinson). The results are given in Figure 8.

Virtually no CD23 expression was induced in transformants #33, #39, or #57. CD23 expression was induced in the novel strain, #27, #30, and #41 by CD40L-CD8 chimeric protein stimulation. The protein encoded by the cDNA of C40-3 lacked the N terminal region of TRAF5, and lacked part of the Zn finger domains and the RING finger domain, but it did have the TRAF-C domain (Figure 1). This protein obviously functions as a dominant negative mutant with respect to the expression of CD23 induced through CD40 signals.

Practical Example 4: Obtaining DNA Coding for Human TRAF5

(1) Screening

A Burkitt B cell lymphoma cell line Daudi cDNA library (by Clontech) was screened by plaque hybridization using the mouse TRAF5 cDNA fragments obtained in Practical Example 1 as probe. Hybridization was managed by incubation at 50°C in hybridization buffer (0.2 M $NaHPO_4$ (pH 7.2), 1 mm EDTA, 1% (W/V) BSA, 7% (W/V) SDS). The filter was finally washed for 30 minutes at 50°C with 1 × SSC/0.1% (W/V) SDS, and autoradiography was performed. Two clones were obtained, so the cDNA fragments were subcloned to pBluescript plasmids. The base sequences of the cDNA fragments were sequenced using an ABI PRIZM Cycle Sequence System (by Perkin-Elmer). Clones with the longest cDNA fragments had 3993 bp cDNA fragments (Sequence ID No. 6 in the Sequence Listing). The plasmids with the cDNA inserted in pBluescript were designated pBShTRAF5.

The *E. coli* line JM109 was transformed with pBShTRAF5 by a common method, and the resulting transformant *E. coli* JM109 (pBShTRAF5) was registered (FERM P-15993) on December 19, 1996, at the Life Sciences Research Institute in the Agency of Industrial Science and Technology of the Ministry of Trade and Industry, at 1-1-3 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Prefecture, Japan. The bacterial strain was subsequently transferred on March 6, 1997 to the International Registry in accordance with the Budapest Treaty, and was designated FERM BP-5857.

(2) Analysis of Human TRAF5 Structure

The structure of the human TRAF5 was analyzed on the basis of the DNA sequence determined in (1) above. Human TRAF5 was consequently assumed to consist of a protein comprising 557 amino acid residues (Signal ID No. 4 in the Sequence Listing). Human TRAF5 has 80% homology with mouse TRAF5 in terms of the amino acid sequence, and 82% homology in terms of the DNA base sequence. Human TRAF5 has a RING finger domain, five Zn finger domains, and a coiled coil domain, in that order, beginning from the N terminal, in the same manner as mouse TRAF5.

(3) Northern Blotting

The poly $(A)^+$RNA of the human B cell lymphoma cell lines Daudi and Raji were prepared by the same method as in Practical Example 1. 12 μg poly $(A)^+$RNA was then electrophoresed using 1% agarose gel containing 6.6% formaldehyde, and blotted using nylon membranes (by Amersham). Probe was prepared in the following manner. 5'-GCAGCAGCCGCGCCTGCAGACCGGC-3' was first synthesized as sense primer, and 5'-ATCCAGGAGCATTGCTGCAATATAC-3' was synthesized as antisense primer. The primers, human TRAF5 cDNA (as template), and Taq polymerase and its reaction reagent (by Toyobo) were then mixed. A reaction was brought about using a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer) for 1 minute at 95°C, 2 minutes at 55°C, and 3 minutes at 72°C. These operations were undertaken for 30 cycles, and the amplified product (around 500 bp) was collected. The DNA fragments were labeled with ^{32}P. The aforementioned nylon membranes were incubated at 65°C in the probe and hybridization buffer (0.2 M $NaHPO_4$ (pH 7.2), 1 mm EDTA, 1% (W/V) BSA, 7% (W/V) SDS). The filter was finally washed for 30 minutes at 65°C with 0.5 × SSC/0.2% (W/V) SDS, and autoradiography was performed. The results are given in Figure 9.

It was confirmed that the human TRAF5 mRNA was about 4 to 5 kb, and that the resulting TRAF5 cDNA was virtually full-length.

Practical Example 5: Confirmation of TRAF5 Signal Transduction Activity

(1) Confirmation of Action in Activating NFkB

The activation of NFkB by human TRAF5 was checked by the same method as in Practical Example 3. 1 μg reporter plasmid ($[kB]_6$TK-CAT or $[kBM]_6$TK-CAT), 1 μg β-actin-β-gal, and 2, 4, and 8 μg pME-FLAG-hTRAF5 were mixed. Samples with no pME-FLAG-hTRAF5 added were used as a control. pME18S was added to bring the total amount of DNA to 10 μg for transfection of 2×10^6 293 T cells by the $CaPO_4$ method. The cells were harvested following 48 hours of transfection, and centrifuged following thawing to prepare a cell extract solution for assay of CAT activity. The results are given in Figure 10.

The TRAF5 resulted in dose-dependent activation of the transcription of kB site dependency in the 293 T cells.

CLAIMS

1. TRAF5 protein, which binds to the intracellular domain of CD40.

2. A polypeptide including at least one of the polypeptides indicated by the amino acid sequence from 45 to 84, 110 to 249, 251 to 403, and 404 to 558 in Sequence ID No. 1 of the Sequence Listing.

3. A polypeptide including at least one of the polypeptides indicated by the amino acid sequence from 45 to 84, 110 to 249, 251 to 403, and 404 to 557 in Sequence ID No. 4 of the Sequence Listing.

4. A polypeptide including a polypeptide as defined in Sequence ID No. 1 of the Sequence Listing.

5. A polypeptide including a polypeptide as defined in Sequence ID No. 4 of the Sequence Listing.

6. A polypeptide comprising a polypeptide, or a portion thereof, as defined in Sequence ID No. 1 of the Sequence Listing.

7. A polypeptide comprising a polypeptide, or a portion thereof, as defined in Sequence ID No. 4 of the Sequence Listing.

8. DNA including a base sequence coding for at least one polypeptide of the polypeptides indicated by the amino acid sequence from 45 to 84, 110 to 249, 251 to 403, and 404 to 558 in Sequence ID No. 1 of the Sequence Listing.

9. DNA including a base sequence coding for at least one polypeptide of the polypeptides indicated by the amino acid sequence from 45 to 84, 110 to 249, 251 to 403, and 404 to 557 in Sequence ID No. 4 of the Sequence Listing.

10. DNA including a base sequence coding for a polypeptide as defined in Claim 6.

11. DNA including a base sequence coding for a polypeptide as defined in Claim 7.

12. DNA including the base sequence, or a portion thereof, in Sequence ID No. 2 of the Sequence Listing.

13. DNA including the base sequence, or a portion thereof, in Sequence ID No. 5 of the Sequence Listing.

14. Antisense oligonucleotides, and derivatives thereof, against DNA as defined in Claim 8, 10, or 12.

15. Antisense oligonucleotides, and derivatives thereof, against DNA as defined in Claim 9, 11, or 13.

16. An antibody which recognizes the TRAF5 protein as defined in Claim 1.

17. An antibody which recognizes a polypeptide as defined in Claim 2, 4, or 6.

18. An antibody which recognizes a polypeptide as defined in Claim 3, 5, or 7.

19. An antibody as defined in Claim 16, 17, or 18, which is an antibody that inhibits the signal transduction of CD40.

20. An antibody as defined in Claim 16, 17, 18, or 19, which is a monoclonal antibody.

21. A vector including DNA as defined in Claim 8, 10, or 12.

22. A vector including DNA as defined in Claim 9, 11, or 13.

23. A transformant obtained using a vector as defined in Claim 21.

24. A transformant obtained using a vector as defined in Claim 22.

25. A method for producing TRAF5 or polypeptide, comprising the culture of a transformant as defined in Claim 23.

26. A method for producing TRAF5 or polypeptide, comprising the culture of a transformant as defined in Claim 24.

27. A method for screening substances that bind to, regulate the activity of, or regulate the expression of, a TRAF5 protein as defined in Claim 1, a polypeptide as defined in any of Claims 2 through 7, or an antibody as defined in an of Claims 16 through 18, characterized by the use of said substances.

28. A substance that binds to, a substance that regulates the activity of, or a substance that regulates the expression of, the TRAF5 protein as defined in Claim 1 or a polypeptide as defined in any of Claims 2 through 7, which is obtained by a screening method as defined in Claim 27.

29. An immunological disease therapeutic containing as an active ingredient a TRAF5 protein as defined in Claim 1 or a polypeptide as defined in any of Claims 2 through 7.

30. An allergy therapeutic containing as an active ingredient a TRAF5 protein as defined in Claim 1 or a polypeptide as defined in any of Claims 2 through 7.

31. An anti-cell growth therapeutic containing as an active ingredient a TRAF5 protein as defined in Claim 1 or a polypeptide as defined in any of Claims 2 through 7.

32. An immunological disease therapeutic containing as an active ingredient an antisense oligonucleotide or derivative thereof as defined in Claim 14 or 15.

33. An allergy therapeutic containing as an active ingredient an antisense oligonucleotide or derivative thereof as defined in Claim 14 or 15.

34. An anti-cell growth therapeutic containing as an active ingredient an antisense oligonucleotide or derivative thereof as defined in Claim 14 or 15.

35. An immunological disease therapeutic containing as an active ingredient an antibody as defined in any of Claims 16 through 20.

36. An allergy therapeutic containing as an active ingredient an antibody as defined in any of Claims 16 through 20.

37. An anti-cell growth therapeutic containing as an active ingredient an antibody as defined in any of Claims 16 through 20.

38. An immunological disease therapeutic containing as an active ingredient a substance as defined in Claim 28.

39. An allergy therapeutic containing as an active ingredient a substance as defined in Claim 28.

40. An anti-cell growth therapeutic containing as an active ingredient a substance as defined in Claim 28.